

FABIOLA MAZZARO AKAISHI

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO
AMBIENTAL EM ESTUDOS DE LABORATÓRIO E
MONITORAMENTO EM CAMPO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Morfologia, área de concentração Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira
Ribeiro

Co-orientadora: Dr.^a Sylvie St-Jean

CURITIBA
2003

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia

Setor de Ciências Biológicas

Universidade Federal do Paraná

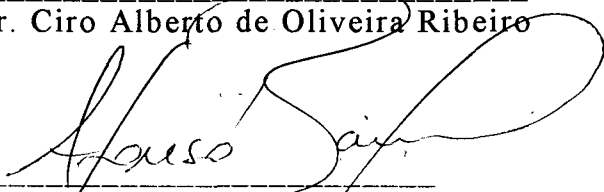
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

PARECER

A Comissão Examinadora de Dissertação de Mestrado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA (FSA) DO PETRÓLEO EM *Astyanax* sp. UTILIZANDO BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO", de autoria da pós-graduanda FABÍOLA MAZZARO AKAISHI, com a Banca constituída pelos Professores: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Orientador e Presidente do Departamento de Biologia Celular da UFPR), Dr. Afonso Celso Dias Bainy (Departamento de Bioquímica da UFSC) e Dr^a. Helena Cristina Silva de Assis (Departamento de Farmacologia da UFPR). Atribui individualmente as seguintes notas: Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, nota: 10.0 (dez); Dr. Afonso Celso Dias Bainy, nota: 9.8 (noventa e oito) e Dr^a. Helena Cristina Silva de Assis, nota: 9.8 (noventa e oito). De acordo com as exigências do Regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, a candidata foi: APROVADA com a nota: 9.9 (noventa e nove), para a devida publicação o trabalho deve sofrer as modificações sugeridas. Em Curitiba, 17 de março de 2003.



Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro



Dr. Afonso Celso Dias Bainy



Dr^a. Helena Cristina Silva de Assis

AGRADECIMENTOS

SER MESTRE.....Este é um grande passo na minha formação profissional. Durante esses dois anos recebi muita ajuda, confiança, estímulo e força e por tudo isso agradeço:

Ao meu orientador, prof. **Dr. *Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro*** por sempre depositar muita confiança nas minhas capacidades, pela amizade, estímulo, orientação e oportunidades.

À prof^a ***Dra Helena Cristina da Silva Assis*** pela colaboração, orientação e disposição no desenvolvimento da metodologia de análise da atividade da acetilcolinesterase.

À **Dra. Sylvie St-Jean** pela oportunidade concedida de desenvolver um projeto em colaboração com o Canadá, pelo incentivo, amizade, confiança e apoio logístico.

À prof^a ***Dra Ângela de Luca Rebello Wagener e Dra Eleine Francioni*** (Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC – RJ) pela colaboração e orientação no desenvolvimento da metodologia de análises de água.

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** da Universidade Federal do Paraná. Pela ajuda no preparo, análise e revelação das fotos do material de Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão. À Daura Regina Eiras-Stofella, Matilde Oliveira e Vera R Pionteke.

À **Fazenda Experimental do Canguiri** da UFPR por possibilitar a obtenção de umas das espécies estudadas (*Astyanax sp.*).

Ao **laboratório de Citogenética Animal** do Departamento de Genética, pela utilização dos tanques de aclimatização.

Ao **laboratório de Metabolismo Celular** do Departamento de Fisiologia, pelo empréstimo de alguns equipamentos indispensáveis para realização do projeto.

Ao Prof. **Ms. Marco A. F. Randi** por toda ajuda, sugestões e apoio.

À prof^a ***Cláudia Ortolani*** pela ajuda com a fixação do material para microscopia eletrônica de transmissão.

Aos **Drs Emillien Pelletier, Simon Courtney e David Cone** pela orientação e colaborações.

Ao **Daniel Poirier, Sarah Kinnie, Dave Robertson e Matthew Hardy** pelas opiniões e colaborações durante a fase de campo em Pictou (Canadá) e em laboratório no Department of Fisheries and Oceans.

À **todos professores do Programa de Pós-graduação** em Biologia Celular e Molecular, por toda contribuição na minha formação como mestre.

A **Deus** por sempre estar comigo me iluminando e me abençoando.

À minha amada e estimada **família**, por sempre me apoiar, me incentivar e pela paciência e força.

Ao **Luiz Adolfo** por todo amor, carinho, respeito, compreensão e paciência.

Às minhas amigas, **Ana Cláudia, Helen e Simone**, pelo incentivo, desabafos, conversas e por todos momentos divididos.

Aos meus **colegas do curso de pós-graduação** e do **laboratório de Toxicologia Celular**, em especial a Fabíola, Inês, Rogério, João e Sibelle, por todos os momentos compartilhados.

À secretária do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, **Marlene B. de Camargo**, por toda ajuda e eficiência no desenvolvimento do seu trabalho.

À **Capes** pela concessão da bolsa de mestrado, contribuindo no aprimoramento, desenvolvimento e realização desse projeto.

E à **Universidade Federal do Paraná** por me acolher desde 1996 quando iniciei o curso de graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	lv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
 INTRODUÇÃO GERAL	 1
1- Escolha do Bioindicador	1
2- Escolha dos Biomarcadores	2
3- Bioensaios e Biomonitoramento	2
 CAPÍTULO I – Estudo da exposição aguda de <i>Astyanax sp</i> à Fração Solúvel na Água (FSA) do petróleo da Bacia de Campos	 4
I.1 INTRODUÇÃO	5
I.1.1 Petróleo: Benefícios X Impactos	5
I.1.2 Composição Química do Petróleo	6
I.1.3 Biodisponibilidade	6
I.1.4 Fração Solúvel na Água e seus Efeitos Tóxicos	6
I.1.5 Histopatologia	7
I.1.6 Neurotoxicidade - Atividade da Acetilcolinesterase	8
I.1.7 Análises Químicas da Água	10
I.1.8 Justificativas do Estudo	10
I. 2 OBJETIVOS	12
I. 2.1 Objetivo Geral	12
I. 2.2 Objetivos Específicos	12
I. 3 MATERIAL E MÉTODOS	13
I. 3.1 Modelo Biológico	13
I. 3.2 Obtenção da Fração Solúvel na Água (FSA) do Petróleo	13
I.3.3 Quantificação de Hidrocarboneto Total na Água Utilizada nas Concentrações Testes Durante o Período Experimental	15
I. 3.3.1 Determinação de Hidrocarbonetos Dissolvidos na Água Usando Extração Líquido-Líquido e Espectrofluorímetro	15
I. 3.4 Bioensaios	18
I. 3.4.1 Microscopia de Luz	20
I.3.4.2 Fixação em Microondas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	22
I.3.4.3 Preparo do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	23
I.3.4.4 Preparo para Microscopia Eletrônica de Varredura	24
I.3.4.5 Atividade da Acetilcolinesterase	24
I.3.4.6 -Tratamento Estatístico	25
I. 4 RESULTADOS	27
I.4.1 Mortalidade	27
I.4.2 Análise Química da Água Exposta a FSA do Petróleo	28
I. 4.3 Histopatologia	31
I. 4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	38
I. 4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	38
I. 4.6 Neurotoxicidade	46
I. 5 DISCUSSÃO	48

I. 6 CONCLUSÕES	54
CAPÍTULO II – O uso de Biomarcadores em Monitoramento Ambiental: O Caso do Porto de Pictou – Canadá	56
II. 1 INTRODUÇÃO	57
II. 1. 2 Biomarcadores Morfológicos e Bioquímicos	57
II. 1. 2 .1- Acetilcolinesterase.....	58
II.1.2.2 – Metalotioneína.....	58
II. 1. 3 Estudo da Comunidade de Parasitas	59
II. 2 OBJETIVOS	60
II. 2. 1 Objetivo Geral	60
II.2.2 Objetivos Específicos	60
II. 3 MATERIAL E MÉTODOS	61
II. 3. 1 Colaboração Internacional	61
II. 3. 2 Área de Estudo	61
II. 3. 3 Espécie Bioindicadora	63
II. 3. 4 Coletas de Campo	64
II. 3. 5 Índice Hepatossomático	65
II.3.6 Fator de Condição	65
II. 3. 7 Histopatologia e Microscopia Eletrônica de Varredura	66
II. 3. 8 Metalotioneína.....	66
II.3.9 Atividade da Acetilcolinesterase.....	68
II.3.10 Medida da Concentração protéica	68
II. 3.11 Estudo da Comunidade de Parasitas	68
II.3.12 Tratamento Estatístico	70
II.4 – RESULTADOS	71
II. 4. 1 Parâmetros Abióticos	71
II. 4. 2 Índice Hepatossomático e Fator de Condição	72
II. 4.3 Histopatologia	75
II. 4. 4 Atividade da Acetilcolinesterase	83
II. 4. 5 Concentração de Metalotioneína	85
II. 4. 6 Parasitas	85
II. 5 DISCUSSÃO	92
II. 6 CONCLUSÕES	97
II.7- PERSPECTIVAS	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

Lista de Tabelas

Tabela 01. Análise química de hidrocarbonetos na água contendo a fração solúvel do petróleo (FSA) em diferentes concentrações (15%, 33% e 50%).

Tabela 2. Resumo das lesões de fígado e brânquias em *Astyanax sp.* depois da exposição aguda à FSA do petróleo.

Tabela 3. Parâmetros abióticos medidos nas áreas estudadas.

Lista de Figuras

Figura 1. Ilustração do preparo da fração solúvel do petróleo em laboratório.

Figura 2. Esquema demonstrando a distribuição dos indivíduos e as concentrações de Fração solúvel utilizadas no bioensaio.

Figura 3. Índice de mortalidade, em porcentagem, dos indivíduos expostos a 15%, 33% e 50% de FSA do petróleo e controle durante 96 horas de experimento.

Figura 4. Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 15% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96 h.

Figura 5. Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 33% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96h.

Figura 6. Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 50% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96h.

Figura 7. Fígado de *Astyanax sp.*, corado com Hematoxilina e eosina. Controle 96 horas e 15% de FSA.

Figura 8. Fígado de *Astyanax sp.* Corado com hematoxilina e eosina. 33 e 50% FSA.

Figura 9. Alterações ultraestruturais (MET) em Fígado de *Astyanax sp.*

Figura 10. Microscopia eletrônica de Transmissão de fígado de *Astyanax sp.* A e B - Exposição a 33% FSA - 96h.

Figura 11. Microscopia de luz de brânquias de *Astyanax sp.* Coloração Hematoxilina e eosina. Controle e 15% FSA.

Figura 12. Microscopia de luz de brânquias de *Astyanax sp.* Coloração Hematoxilina e Eosina. 33 e 50% FSA.

Figura 13. Microscopia eletrônica de Varredura de Brânquias de *Astyanax sp.* 15, 33 e 50% FSA.

Figura 14. Atividade da acetilcolinesterase em indivíduos provenientes dos grupos expostos a 15% da FSA durante 12, 24 e 96h.

Figura 15. Atividade da acetilcolinesterase nos grupos expostos a 33% da FSA durante 12, 24 e 96h.

Figura 16- Atividade da acetilcolinesterase nos grupos expostos a 50% da FSA durante 12, 24 e 96h

Figura 17. Mapa do Porto de Pictou, Nova Scotia , Canadá.

Figura 18. Espécime fêmea adulto de *Fundulus heteroclitus*.

Figura 19. Armadilha de metal, conhecida como cova e rede de arrasto.

Figura 20. Média do Comprimento total de indivíduos machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 21. Média do peso total de indivíduos machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus*.

Figura 22. Índice hepatossomático de machos e fêmeas da espécie *Fundulus Heteroclitus*, amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 23. Fator de condição de machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 24. Microscopia de luz de fígado de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Áreas Controle e efluente de indústria de papel.

Figura 25. Microscopia de luz de fígado de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Esgoto tratado e não-tratado.

Figura 26. Microscopia de luz de brânquias de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Áreas referências e indústria de papel.

Figura 27. Microscopia de luz de brânquias de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Esgoto tratado e não-tratado e água aquecida.

Figura 28. Atividade da Acetilcolinesterase em cérebro da espécie *Fundulus heteroclitus* coletada em duas áreas de referências (CAR e MER) e áreas que recebem os seguintes efluentes: água aquecida (PP), Esgoto tratado (ERPAS) e não-tratado (CG), indústria de papel (BH) e atividade agrícola (WR).

Figura 29. Atividade da Acetilcolinesterase em músculo da espécie *Fundulus heteroclitus* coletada em duas áreas de referência e áreas que recebem os

seguintes efluentes: água aquecida, Esgoto tratado e não-tratado, indústria de papel e atividade agrícola.

Figura 30. Concentração de metalotioneína em brânquias de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 31. Prevalência (%) de infecção de *Myxobolus funduli* em brânquias de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 32. Prevalência de *Myxobolus subtecalis* em rim posterior de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 33. Prevalência de *Kudoa funduli* em musculatura esquelética de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 34. Prevalência de formas larvais Digenea em brânquias de *Fundulus heteroclitus*, amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 35. Prevalência de formas adultas de Digenea no lúmen intestinal de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes.

Figura 36. Microscopia de luz de *Kudoa funduli* em músculo de *Fundulus heteroclitus*.

Figura 37. Infecção parasitária em *Fundulus heteroclitus*. Análise em Microscopia de luz.

Lista de Abreviaturas

AChE - Acetilcolinesterase
BH - Boat Harbour
CAR - Caribou
CG - Camping Ground
ChEs - Colinesterases
CO₂- Dióxido de carbono
DMSO - Dimetil sulfóxido
EDTA - Ácido acético tetraetilenediamina
ERPAS - Secondary treated municipal sewage
FC - Fator de condição
FSA - Fração solúvel em água.
GSH - Glutathione
H₂O_d - Água destilada
HPA - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HSP 70 - Proteína de estresse 70
IH - Índice hepatossomático
LC - Concentração letal
LM - Light microscopy
MBT - Mono-butil-estanho
MER - Merigomishi
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
ML - Microscopia de Luz.
MS 222- Tricafina
Na - Sódio
Na₂SO₄ - Sulfato de sódio
PP - Power Plant
SEM - Scanning Electron Microscopy
SH - Grupos sulfidrilas
TEM - Transmission Electron Microscopy
UFPR - Universidade Federal do Paraná
WR - West River

RESUMO

O ambiente aquático sofre impactos causados pela produção e despejo indiscriminado de petróleo, metais pesados, pesticidas, resíduos provenientes de indústrias e esgoto doméstico, e os efeitos tóxicos a eles relacionados podem ser melhor entendidos através do uso de biomarcadores. Este trabalho foi dividido em duas etapas. Na etapa I deste estudo foi verificado os efeitos tóxicos da FSA do petróleo da Bacia de Campos a nível morfológico e bioquímico, na espécie de peixe tropical de água doce *Astyanax sp.*. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e a sua fração solúvel na água (FSA) é altamente volátil e tóxica. Para esta etapa I, foram realizados experimentos agudos com duração de 96 horas, expondo a espécie *Astyanax sp.* a 15, 33 e 50% da FSA do petróleo e também foi quantificada a concentração de hidrocarbonetos na água. Os indivíduos foram amostrados em 12, 24 e 96 horas após a contaminação. Foram realizadas análises de microscopia de luz (ML) para fígado e brânquias, microscopia eletrônica de varredura (MEV) para brânquias e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para fígado. Amostras de músculo foram coletadas para medir a atividade da acetilcolinesterase. Na etapa II foi realizado um estudo dos efeitos tóxicos de efluentes provenientes da indústria de papel, usina de energia elétrica (água aquecida), esgoto e agricultura em *Fundulus heteroclitus* (espécie de peixe comum nos estuários do oceano atlântico canadense) através de biomarcadores bioquímicos, imunológicos e morfológicos, além de aspectos ecológicos (comunidade de parasitas). A realização desta etapa surgiu através de uma colaboração internacional com o Department of Fisheries and Oceans do Canadá. Nesta etapa II, *Fundulus heteroclitus* foi amostrado no estuário (Porto de Pictou) em maré alta. O fígado foi amostrado para ML. As brânquias para ML, MEV e concentração de metalotioneína. Amostras de músculo e cérebro foram usados para atividade da Acetilcolinesterase. Indivíduos inteiros foram fixados para o estudo da comunidade de parasitas. A análise química da fração solúvel realizada na etapa I demonstrou uma volatilização dos hidrocarbonetos nas primeiras horas de exposição. Tanto na etapa I quanto na II foram observadas necroses no tecido hepático, desaparecimento do limite celular e citoplasma hepático homogêneo. Nas brânquias da espécie *Astyanax sp.* e *Fundulus heteroclitus* ocorreram aneurismas, dilatação e desorganização da lamela secundária e proliferação celular na lamela secundária. Estas alterações branquiais foram observadas em MEV para *Astyanax sp.*. No fígado exposto a FSA na etapa I, analisado em MET, foram observadas células em apoptose. A atividade da acetilcolinesterase na etapa I, foi inibida nos indivíduos expostos a 33% FSA durante 24 e 96 horas. Já na etapa II, para *F. heteroclitus* a atividade da acetilcolinesterase em músculo e cérebro foi menor nas áreas referências e maior no efluente pesticidas, esgoto e indústria de papel. A concentração de metalotioneína nos efluentes pesticida, água aquecida e esgoto foi menor que a das áreas referências. No estudo da comunidade de parasitas realizado na etapa II, houve uma baixa prevalência de larvas e adultos de parasitas do grupo Digenea e *Kudoa funduli* no efluente indústria de papel. *Myxobolus funduli* não ocorreu nos efluentes pesticidas e água aquecida e *Myxobolus subtecalis* infectou mais indivíduos do efluente papel. Estes resultados demonstram a toxicidade da FSA (etapa I) e dos demais efluentes (etapa II) estudados, além de proporcionar o aprendizado de novas metodologias para uso de biomarcadores de contaminação.

ABSTRACT

The aquatic environment is subjected to serious impacts caused by the production and discharge of petroleum, heavy metals, pesticides, residues of industries and domestic sewage. The toxic effects of petroleum and other effluents, on organisms, can be better understood through the use of biomarkers. This study was divided in two parts. In part I was verified the toxic effects of WSF of Bacia de Campos' petroleum in a tropical and freshwater fish species *Astyanax sp.* by using morphological and biochemical biomarkers. Petroleum is a complex mixture of hydrocarbons, in which, the water soluble fraction of petroleum (WSF) is composed of highly volatile and toxic hydrocarbons. In the WSF experiments, *Astyanax sp.* was held in the laboratory and exposed to 15, 33 and 50% treatments of WSF for 96 hours to induce punctual physiological responses. Hydrocarbon concentration in the water was monitored. The animals were sampled at 12, 24 and 96 hours after exposure. Analyses included: Liver and gills for light microscopy (LM); Gills for scanning electron microscopy (SEM) and liver for transmission electron microscopy (TEM). Samples of muscle were collected to test acetylcholinesterase activity. In part II, was verified the toxic effects of effluents from pulp and paper industry, a coal-operated power plant (warm water), domestic sewage and agriculture. Biochemical and morphological biomarkers as well as ecological aspects (community of parasites) were evaluated in *Fundulus heteroclitus*, a common fish in Atlantic Canadian estuaries. The part II was accomplished, through an international collaboration with Department of Fisheries and Oceans Canada. In part II, *Fundulus heteroclitus* were sampled from the estuary at the high-tide. Liver was analysed to LM. Gills was used for LM, SEM and metallothionein concentration. Muscle and brain was collected to measure the acetylcholinesterase activity. Whole animals were fixed to study the community of parasites. In part I, the chemical analyses showed the volatility of WSF of petroleum in the first hours of exposition. In Part I and II was found common lesions in tissues how hepatic necrosis, no cellular limit and homogeneous hepatic cytoplasm. The gills of *Astyanax sp.* and *Fundulus heteroclitus* showed lesions like aneurysms, dilation and disorganisation of the secondary lamellae and cellular proliferation in the secondary lamellae. These gills lesions were confirmed with SEM for *Astyanax sp.* Through TEM it was possible to observe apoptotic cells in livers exposed to WSF. The acetylcholinesterase activity in part I was lower in animals exposed to 33% WSF during 24 and 96 hours. For *F. heteroclitus*, the acetylcholinesterase activity in muscle and brain was lower in control areas and higher in the pesticides, sewage and pulp and paper industry effluent sites. Low metallothionein concentration was observed in the pesticides, warm water and sewage effluents sites. The parasite species prevalence was low for larvae and adults of Digenea and *Kudoa funduli* in pulp and paper effluent. *Myxobolus funduli* prevalence wasn't presented in pesticides and warm water effluents sites. *Myxobolus subtecalis* was in a higher prevalence in paper effluent. Results of these studies demonstrate the toxicity of WSF (part I) and the other effluents studied (part II), as well as the benefits of learning of new methodologies and the use of biomarkers in toxicological studies.

INTRODUÇÃO GERAL

O ambiente aquático é um dos ecossistemas que mais sofre impactos causados pela ação antropogênica, uma vez que constituem os compartimentos finais de vários produtos gerados pela atividade humana. Os despejos industriais, esgotos, derramamentos de petróleo e/ou óleo, agrotóxicos e várias das atividades que desenvolvemos em nosso dia-a-dia, contribuem de alguma forma com a geração de produtos persistentes que afetam importantes ecossistemas naturais como rios, lagos e oceanos. A preocupação em preservar e manter a qualidade desses ecossistemas vem crescendo nas últimas décadas e vários estudos têm sido realizados no aprimoramento e desenvolvendo de metodologias, com o intuito de compreender melhor o potencial tóxico destes produtos no ambiente aquático. Um estudo em toxicologia ambiental deve considerar alguns aspectos importantes, pois somente assim será possível contribuir com informações que possibilitem uma melhor compreensão e a solução dos problemas ambientais. Dentre tais aspectos encontram-se: a escolha do modelo de estudo (bioindicador); a escolha dos parâmetros analisados (biomarcadores); e o tipo de design experimental (em campo ou em laboratório).

1- Escolha do Bioindicador

Um bioindicador é definido como a espécie que será utilizada no estudo, conhecidos também como espécie sentinela (ADAMS, 2002) e são utilizados como os primeiros indicadores de efeitos do estresse causado por contaminantes em altos níveis de organização (ADAMS, 2002).

Ao escolher um bioindicador deve-se observar algumas características importantes, de acordo com o estudo que será desenvolvido. Um bioindicador ideal deve sobreviver em ambientes saudáveis, mas também apresentar uma resistência relativa aos contaminantes a que está exposto, além disso é importante que esse organismo represente os níveis tróficos superiores da cadeia alimentar. Outros aspectos do bioindicador que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo, é a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios em laboratório.

Neste projeto foram estudadas duas espécies de peixes (*Astyanax sp.* - tropical e *Fundulus heteroclitus* - nórdica). Ambas, são abundantes no ambiente aquático e se adaptam bem às condições de laboratório.

2- Escolha dos Biomarcadores

Segundo WALKER et al. (1996), os biomarcadores são definidos como alterações biológicas que expressam a exposição e os efeitos tóxicos dos poluentes presentes no ambiente. São considerados como uma ferramenta indispensável para programas de monitoramento, pois apresentam grande susceptibilidade, boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise (STEGEMAN et al., 1992; BAINY, 1993). A análise desses parâmetros permite que ocorra: (1) uma detecção precoce da existência de contaminação por substâncias tóxicas biologicamente significativas, (2) identificação de espécies ou populações em risco de contaminação, (3) magnitude da contaminação e, o que é fundamental, (4) determinação do grau de severidade dos efeitos causados pelos compostos xenobióticos (STEGEMAN et al., 1992). Os biomarcadores são sensíveis aos agentes estressores e respondem rapidamente ajudando a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos. No entanto, uma das maiores limitações do uso de um biomarcador é que geralmente este pode apresentar uma grande variabilidade de resposta (ADAMS, 2002).

Existem várias características que devem ser consideradas quando decide-se utilizar um ou mais biomarcadores. Entre as mais importantes estão o grau de especificidade e de sensibilidade do biomarcador com relação ao xenobionte, a variabilidade e a escala de tempo da resposta, e a relevância ecológica (ADAMS, 2002). Os biomarcadores podem ser estudados a nível genético, bioquímico, histopatológico, fisiológico, reprodutivo, populacional e até a nível de comunidades. Para se entender melhor o que acontece com uma população que está sendo afetada por um ou vários contaminantes, deve-se primeiro entender os mecanismos básicos de ação destes a nível de organismo e suborganismo, o que envolve estudos de biologia molecular, bioquímicos, células, tecidos e fisiologia, a partir dos quais torna-se possível entender melhor os efeitos dos contaminantes no indivíduo, transpondo tais dados para a população ou comunidade. Sendo assim, faz parte do presente estudo, enfatizar a utilização de metodologias que permitem conhecer a ação de contaminantes a nível mais basais de organização biológica.

3- Bioensaios e Biomonitoramento

Para entender a ação tóxica dos contaminantes pode-se trabalhar com experimentos laboratoriais que utilizam bioensaios ou estudos no campo. Isto

permite enfoques diferentes como a obtenção de dados e padronização de metodologias que possam prever ou avaliar um determinado efeito; e o acompanhamento dos efeitos obtidos diretamente do local impactado. Apesar de serem complementares, há que se tomar cuidado com a validação dos dados gerados em laboratório, antes de relacioná-los com o ambiente natural.

O uso de bioensaios em estudo de toxicologia é interessante por permitir estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes em organismos de forma isolada ou associados, minimizando a influência das variáveis ambientais e possibilitando o estudo da especificidade relativa de alguns efeitos com os contaminantes. Por outro lado, os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar com uma base de dados que venham a ajudar a entender os fatores que estão interferindo na saúde dos organismos, e/ou alterando as condições do próprio ambiente em que vivem.

O biomonitoramento permite observar a real situação do ambiente e dos organismos impactados, assim como todas as relações dos efeitos dos xenobiontes entre si e os fatores físicos aos quais os organismos são submetidos. Apesar do grande número de variáveis ambientais dificultar a interpretação e o conhecimento dos efeitos isolados causados pelos contaminantes, o estudo de monitoramento de campo permite uma avaliação mais ampla das condições *in natura*, o que representa importantes informações para tomadas de decisões.

Reconhecidamente, tanto os estudos de bioensaios em laboratório como os de biomonitoramento em campo, contribuem com importantes informações para os estudos em toxicologia ambiental, sendo ferramentas extremamente relevantes nos diagnósticos de áreas impactadas.

CAPÍTULO I

ESTUDO DA EXPOSIÇÃO AGUDA DE *Astyanax sp* À FRAÇÃO SOLÚVEL DO PETRÓLEO NA ÁGUA (FSA)

Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná

Orientação:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Departamento de Biologia Celular/UFPR

Colaboração:

Profa. Dra. Helena Cristina Silva de Assis
Departamento de Farmacologia/UFPR
Profa. Dra. Angela Wagener
Departamento de Química/PUC-RJ

I.1- INTRODUÇÃO

Do início da revolução industrial até os dias atuais, vem ocorrendo um aumento na dispersão de contaminantes no ambiente aquático, principalmente aqueles de origem antropogênica. Os contaminantes de uma maneira geral podem causar perturbações metabólicas, comprometendo os processos fisiológicos vitais, tais como respiração, reprodução e crescimento (STEGEMAN et al., 1992). Isto pode refletir em uma diminuição dos estoques pesqueiros e diminuição da qualidade dos recursos vivos. Além disso, muitas das substâncias poluidoras causam problemas particulares para o ambiente aquático dulcícola ou marinho, visto que apresentam ao mesmo tempo toxicidade, persistência e bioacumulação na cadeia alimentar. Desse modo, a ingestão de organismos contaminados pode comprometer a saúde dos animais, com riscos para a população humana.

I.1.1- Petróleo: Benefícios X Impactos

A descoberta dos benefícios do uso do petróleo e suas vantagens para o desenvolvimento da indústria, refinarias na produção de combustíveis e derivados, e da sociedade em geral, fez com que houvesse um aumento no consumo do mesmo de tal ordem, que hoje tornou-se um produto indispensável para garantir a qualidade de vida do homem. Por outro lado, o beneficiamento do petróleo trouxe também problemas de ordem ambiental e social, os quais têm se agravado com o aumento da demanda em função do crescimento da atividade industrial, do consumo de derivados e da frota de veículos dependentes desta fonte de combustíveis. Segundo o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos (1985), a exposição de organismos aquáticos ao petróleo e seus derivados pode potencialmente prejudicar os recursos pesqueiros de muitas maneiras, incluindo a redução nas taxas de estoque de peixes. Embora haja um esforço para minimizar tais impactos, o aumento da atividade petrolífera e a ocorrência de acidentes cada vez mais freqüentes nos últimos anos em rios, lagos e oceanos (como ocorrido na Baía de Guanabara – RJ, Rio Iguaçu – PR; Serra do Mar – PR, a Plataforma em Campos- RJ e o Porto de Paranaguá – PR, Costa da Espanha, só para citar os mais recentes), têm preocupado a comunidade científica no sentido de desenvolver metodologias mais eficientes no diagnóstico dos efeitos sobre o ambiente natural e nos conseqüentes riscos para a saúde humana.

I.1.2- Composição Química do Petróleo

O petróleo assim como seus óleos derivados são misturas complexas de compostos orgânicos. De acordo com NEFF (1978), 75% dos constituintes do petróleo são hidrocarbonetos de cadeias longas e curtas. Os hidrocarbonetos de cadeias curtas são voláteis e permanecem menos tempo no ambiente aquático, mas são estes que apresentam o maior potencial tóxico aos organismos (BRAUNER et al., 1999). Apesar desses compostos altamente tóxicos serem voláteis, registros da literatura mostram que os peixes podem absorver parte da fração solúvel do petróleo e seus derivados muito rapidamente, com consequências adversas para a saúde dos mesmos (COLLIER et al., 1996).

I.1.3 - Biodisponibilidade

O petróleo ou seus derivados, após atingir o ambiente aquático, pode passar por diferentes processos, como a evaporação, dissolução, oxidação, sedimentação, biodegradação e absorção pela biota. Esses processos, coletivamente, determinam o destino destes produtos e os seus impactos sobre os ambientes naturais. No entanto, o processo de dissolução com a água, que ocorre logo após o contato tem uma importância especial do ponto de vista toxicológico. Embora dependa da turbulência do corpo d'água, geralmente a quantidade de óleo dissolvido na água é pequena. No entanto, é essa fração solúvel que causa os impactos mais imediatos aos organismos aquáticos, sendo assim considerado um importante determinante de toxicidade do petróleo e seus derivados em acidentes (SAEED e MUTAIRI, 1999).

I.1.4- Fração Solúvel na Água e seus Efeitos Tóxicos

Trabalhos indicam que a fração solúvel do petróleo e seus derivados na água (FSA) é uma mistura complexa de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), fenóis e compostos heterocíclicos contendo nitrogênio e enxofre (ANDERSON et al., 1974; MACKAY e SHIU, 1976). Experimentos realizados demonstram que animais intertidais (estrela-do-mar, cracas, moluscos entre outros) respondem mais lentamente ao óleo e nenhum deles morreu durante uma semana de exposição a 1,2 mg/l de óleo (LC 50), enquanto que peixes pelágicos foram mais sensíveis nas mesmas condições (MOLES, 1998). Muitos estudos demonstram que a absorção da FSA por peixes teleósteos causa alterações que comprometem a sobrevivência desses organismos no ambiente, assim como o seu consumo pela população humana. Os hidrocarbonetos derivados do petróleo provocam danos

estruturais nas lamelas respiratórias das brânquias (DIMICHELE e TAYLOR, 1978; POIRIER et al., 1989; CORREA e GARCIA, 1990; ENGELHARDT et al., 1981; PRASAD, 1991), comprometendo as trocas gasosas com o meio e resultando em hipoxia, sendo essa a principal causa da morte acidental em massa; além disso, lesões hiperplásicas envolvendo células mucosas e de cloreto foram observadas (SPIES et al., 1996). ALKINDI et al. (1996) descreveu uma redução da quantidade de oxigênio no sangue de *Hoplosternum littorale* dentro de 3 horas de exposição a 50% FSA de petróleo da Base de Urucú na Amazônia Brasileira. Os hidrocarbonetos apresentam também ação narcótica (PATTEN, 1977; CORREA e GARCIA, 1990) podendo também serem acumulados em ovos de peixes e até serem transferidos para larvas após a eclosão dos ovos (GOKSOYR et al., 1991). SPIERS et al. (1996) observou necroses múltiplas e um variável número de macrófagos e linfócitos no fígado de organismos expostos a uma fonte natural de petróleo no canal de Santa Bárbara (EUA).

Alguns estudos demonstraram ainda que os hidrocarbonetos do petróleo elevam as concentrações de cortisol no plasma (DI MICHELE e TAYLOR, 1978; LEVITAN e TAYLOR, 1979; ENGELHARDT et al., 1981; LELOUP-HATEY e HARDY, 1985). O aumento na concentração destes hormônios deprimem a função da tireóide (REDDING et al., 1986; BROWN et al., 1985) tendo como consequência alterações no comportamento reprodutivo e alimentar do organismo exposto. A presença de metabólitos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na bile, aumento da atividade das oxigenases de função mista e presença de aductos de DNA em juvenis de Bacalhau (*Gadus morhua*) expostos a fração solúvel do óleo cru do Mar Norte, demonstram mais uma vez a atuação dessa fração nos teleósteos, modificando o metabolismo dos indivíduos afetados (AAS et al., 2000).

Uma variedade de compostos genotóxicos orgânicos estão associados aos constituintes do petróleo e são capazes de causar danos cromossomais, como quebras, fragmentações e inclusive aberrações celulares (HOUK, 1992; MC BEE et al., 1987).

I.1.5- Biomarcador Morfológico

Muitos biomarcadores podem ser utilizados para detectar e quantificar os danos causados aos organismos aquáticos por contaminantes. A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição a estressores a nível de indivíduo, representando um nível intermediário de

organização biológica. As lesões detectadas em células, tecidos ou órgãos representam uma integração dos efeitos cumulativos dos stressores a nível fisiológico e bioquímico e potencialmente a níveis mais altos da organização biológica (MYERS e FOURNIE, 2002).

Biomarcadores morfológicos são definidos como lesões que sinalizam efeitos resultantes da exposição a um ou vários xenobiontes (HINTON et al., 1992). A histopatologia juntamente com os parâmetros bioquímicos permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes.

A análise de parâmetros morfológicos é um importante e rápido método na detecção dos efeitos agudos e crônicos de exposição em vários tecidos e órgãos dos seres vivos (HINTON et al., 1992). Recentemente, vem ocorrendo o enriquecimento e a implementação da literatura relacionada ao uso de biomarcadores histopatológicos de estresse ambiental, promovendo uma base forte para o uso desse biomarcador como indicador de adversidades, efeitos crônicos subletais e injúrias para vertebrados aquáticos marinhos (especialmente peixes), em ambientes biomonitorados ou mesmo em experimentos em laboratório (MYERS e FOURNIE, 2002); no entanto, ainda não existe muita informação na literatura quando se trata de vertebrados aquáticos dulcícolas. Uma vantagem na utilização da histopatologia como um biomarcador é que ela permite uma melhor visualização do efeito a nível celular, tecidual e sistêmico. Enquanto que os estudos bioquímicos utilizam os homogenatos provenientes dos órgãos, detectando efeitos tóxicos e alterações em enzimas e proteínas, mas estes estudos não permitem detectar quais células são realmente responsáveis pelas mudanças bioquímicas, uma vez que grande parte dos tecidos são misturas de diferentes células. O estudo de toxicologia ambiental ideal, seja ele um bioensaio ou um biomonitoramento, seria aquele que utilizasse um conjunto de biomarcadores, tendo dessa forma uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (HINTON et al., 1992).

1.1.6– Neurotoxicidade - Atividade da Acetilcolinesterase

A Acetilcolinesterase (AChE) é um biomarcador não muito utilizado para o estudo dos efeitos tóxicos de hidrocarbonetos do petróleo, mas de acordo com PAYNE et al. (1995), detergentes, óleos e efluentes de indústria de papel podem conter inibidores da acetilcolinesterase. A maioria dos estudos da atividade da acetilcolinesterase estão relacionados com exposições a organofosforados e

carbamatos, pois estes são inibidores específicos do sítio de ligação da acetilcolinesterase e muito já se conhece sobre este efeito (GALGANI e BOQUENE.,1990; HOGAN et al.,1968). Alguns trabalhos relatam a inibição da AChE por outros xenobiontes que não organofosforados e carbamatos, por isso o interesse em estudar a atividade dessa enzima em indivíduos expostos a fração solúvel do petróleo (PAYNE et al.,1995; LABROT, et al.,1996; GUILHERMINO et al.,1998; GALGANI e BOQUENE, 1990). Estudos recentes *in vivo* no nosso laboratório, mostram no entanto que esta enzima pode ser inibida também pelo chumbo inorgânico, após exposição trófica e subcrônica. A AChE é muito importante para a manutenção e equilíbrio da transmissão dos estímulos nervosos pois catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, que é então transformado em colina e acetato, com a liberação de um próton (STENESH, 1998).

Os efeitos neurotóxicos resultantes da inibição da AChE podem ocorrer tanto no sistema nervoso central como no periférico, autônomo ou somático. Alterações do sistema nervoso autônomo parassimpático (efeito colinérgico pré e pós-ganglionar) são muito comuns em contaminações, quando o xenobionte inibe a AChE. A atividade da AChE é comumente determinada no cérebro e em eritrócitos. Já para a atividade das ChEs usa-se a determinação no plasma, ou músculo.

Essa hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor já tenha cumprido seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós-sináptica permitindo sua abertura, a entrada de íons Na^+ e a despolarização da membrana pós-sináptica, o que irá propagar o potencial de ação subsequente. Quando a atividade da AChE é inibida de alguma forma, há um bloqueio na transmissão de impulsos nervosos, o que rapidamente paralisa as funções vitais (STENESH, 1998). Isso ocorre pela sobreposição dos impulsos nervosos, devido a permanência dos canais de Na^+ abertos e a não reciclagem da acetilcolina. A inibição da acetilcolina em organismos, que não peixe, está associada com a disfunção cardiovascular, respiratória e gastrointestinal, hiperatividade ou letargia, perda da consciência, fraqueza muscular e colapso respiratório (HODSON, 2002). Além disso, a inibição dessa proteína pode resultar em alterações do comportamento do animal, dentre eles, a busca por alimento, a reprodução, a locomoção e até mesmo a relação presa-predador, colocando em risco a permanência da espécie em um determinado ecossistema. No entanto, a AChE *in vitro* é capaz apenas de degradar um substrato específico, o iodeto de acetil- β -(metil)tiocolina e atualmente tem-se empregado a inibição da

atividade das ChEs como um eficiente biomarcador de contaminação em peixes (STURM et al., 1999)

Nos ambientes aquáticos próximos aos grandes centros, ocorre freqüentemente o despejo de diferentes compostos provenientes de resíduos industriais e urbano. Desta forma, quando acontece o derramamento acidental de petróleo e/ou seus derivados nesses ambientes, torna-se difícil a determinação dos reais efeitos destes compostos, devido ao efeito cumulativo de outros resíduos de natureza diversa que já se encontram nestes ambientes. A interação destes produtos com a fração solúvel do petróleo ou óleos derivados não é entendida ainda e, certamente, efeitos sinérgicos ou antagônicos irão ocorrer, podendo ou não amplificar o efeito. Assim, conhecendo a resposta da AChE na presença de hidrocarbonetos em laboratório, da mesma maneira que já se tem estabelecido para organofosforados e carbamatos, pode facilitar a interpretação dos efeitos tóxicos destes contaminantes sobre a AChE na ocorrência de derramamentos ou qualquer outro tipo de acidente ambiental envolvendo o petróleo.

I.1.7- Análises Químicas da Água

Conhecer a composição de hidrocarbonetos da fração solúvel do petróleo estudado é um importante fator para uma correlação dose/efeito. Muitas técnicas são utilizadas para a determinação da composição e concentração de hidrocarbonetos na água. As mais conhecidas são cromatografia gasosa com espectrometria de massa e espectrometria de absorção atômica. Mais recentemente, começou-se a usar a técnica de espectrofluorimetria para essa determinação, pois além de ser mais econômica, é mais simples e tem uma alta sensibilidade para detecção dos hidrocarbonetos nas amostras.

I.1.8- Justificativas do Estudo

O derramamento de óleo e/ou derivados em ecossistemas de água doce são menos freqüentes se comparado com acidentes marinhos. De acordo com GROSSLING (1976), somente 35% de óleo são despejados nos ambientes terrestre ou dulcícola e estes estão mais relacionados com derramamentos durante o transporte. Apesar desse índice não ser tão expressivo é importante conhecer os danos que o petróleo e seus derivados podem causar nos ecossistemas aquáticos continentais assim como nos organismos que vivem nestes ambientes.

O interesse em estudar os efeitos tóxicos causados pela FSA do petróleo em laboratório, deve-se à obtenção de dados controlados com o objetivo de diagnosticar os reais efeitos da fração solúvel em organismos de água doce, através da utilização de bioensaios, simulando as primeiras horas de contato do petróleo com o ambiente natural. Somente através dos bioensaios podemos estudar os efeitos tóxicos da FSA do petróleo, sem a interferência de outros compostos tóxicos ou não, presentes no ambiente natural. Além disso, este estudo contribui com informações sobre a ação da FSA sobre os peixes dulcícolas encontrados em ambiente tropical e subtropical, dados atualmente escassos ou inexistentes na literatura consultada. Este mesmo estudo contribuirá ainda, com uma base de importantes dados para futuros estudos envolvendo a interferência da FSA do petróleo na saúde dos organismos aquáticos, com reflexos para a saúde humana.

I. 2- OBJETIVOS

I. 2.1- Objetivo Geral:

- Verificar os efeitos tóxicos da fração solúvel do petróleo da Bacia de Campos (FSA), a nível morfológico e bioquímico, na espécie de peixe tropical e subtropical de água doce *Astyanax sp.*

I. 2.2- Objetivos Específicos:

- Quantificar a concentração total de hidrocarbonetos da fração solúvel (FSA) do petróleo originado da Bacia de Campos, durante o experimento em diferentes tempos de amostragem.
- Estudar os efeitos morfológicos da FSA, a partir de testes de bioensaio após exposição aguda, com avaliação histopatológica e ultraestrutural em fígado e brânquias de *Astyanax sp.*
- Estudar os efeitos neurotóxicos da FSA através de testes de bioensaio após exposição aguda com avaliação da taxa de inibição da acetilcolinesterase em músculo de *Astyanax sp.*
- Obter dados que permitam conhecer seus efeitos nas primeiras horas de exposição, e discutir e propor medidas que minimizem o efeito da FSA em ecossistemas neotropicais de água doce, em decorrência de derramamentos de petróleo e óleos derivados nestes ambientes.

I. 3- MATERIAL E MÉTODOS

I. 3.1- Modelo Biológico

A espécie de peixe *Astyanax sp* (Lambari) pertence à família Characidae e à subfamília Tetragonopterinae e foi escolhida como modelo biológico para este estudo por apresentar uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada em todos os rios, riachos, corredeiras e até poças d'água desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (GERY, 1977). É altamente utilizada para consumo humano, mas apresenta um médio valor comercial, devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, é uma espécie de grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso essa espécie é transformadora de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores como os piscívoros. Apresenta uma dieta onívora, podendo se nutrir de vegetais e larvas de pequenos insetos, tendo papel essencial no equilíbrio do ecossistema (SANTOS, 1981).

Os exemplares dessa espécie foram obtidos na Fazenda Experimental do Canguiri, da Universidade Federal do Paraná. No laboratório de citogenética animal do Departamento de Genética/UFPR, os indivíduos foram mantidos em tanques de 250L para a aclimação, tendo algumas condições controladas como temperatura, mantida entre 20 e 22°C e o fotoperíodo de 12h/claro e 12h/escuro. Durante a aclimação foram alimentados com ração comercial com freqüente limpeza dos tanques e aeração constante. Os indivíduos permaneceram em aclimação por 15 dias antes de iniciar os experimentos.

I. 3.2- Fração Solúvel do Petróleo na Água (FSA)

A FSA do petróleo foi preparada segundo ANDERSON et al.(1974). Foram usados dois recipientes de vidros (5000 ml). Nesses recipientes foi colocado uma (1) parte de petróleo para dez (10) partes de água doce reconstituída. Esse volume total variava de acordo com a concentração utilizada no experimento. No interior do recipiente foi colocado um agitador magnético, que manteve a água em movimento por um período de 20 horas em temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) (Figura 1). Os recipientes foram vedados com plástico PVC para minimizar a evaporação dos hidrocarbonetos mais voláteis. Após a mistura, o óleo e a fase solúvel em água foram separados através da utilização do recipiente com torneira, que permitiu a

retirada da água sem haver a mistura com o petróleo. Essa solução de água contendo a fração solúvel foi considerada a solução 100%.

A FSA a 100% passou por mais três diluições, neste caso a diluição foi realizada no próprio aquário, possibilitando a obtenção das concentrações teste de 15%, 33% e 50% de FSA do petróleo. Que foram testadas durante o experimento agudo, utilizando o bioensaio. Estas concentrações foram estabelecidas usando como parâmetro o único estudo dos efeitos da fração solúvel em água de óleo cru em peixes de água doce (BRAUNER et al., 1999). As amostras de Petróleo utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Refinaria da Petrobrás de Araucária (REPAR), Araucária – PR, tendo como origem a Bacia Petrolífera de Campos, Campos – RJ.

Água Reconstituída

Obtém-se água destilada e deionizada e adiciona-se os seguintes sais:

- 0,0065 g/l CaCl_2
 - 0,1335 g/l MgSO_4
 - 0,0004 g/l KCl
 - 0,0105 g/l NaHCO_3
- pH = 7,2 - 7,3



Figura 1- Ilustração do preparo da fração solúvel do petróleo em laboratório.

I.3.3- Quantificação de Hidrocarboneto Total na Água Utilizada nas Concentrações Testes Durante o Período Experimental

Foi realizado um experimento sem a presença dos organismos testes no Laboratório de Química Ambiental na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ), sob a orientação da prof.a Dra. Ângela de Luca Rebello Wagener e Dra. Eleine Francioni. O objetivo desta análise foi estabelecer o comportamento e a concentração total dos hidrocarbonetos da FSA durante as 96 horas de exposição, antes de iniciar os experimentos com os organismos teste. Para isso, foram montados aquários com 10 litros de água reconstituída e foi adicionada a fração solúvel. As concentrações usadas foram as mesmas estabelecidas para o experimento com Lambari (15%, 33% e 50% da FSA). A temperatura, pH, aeração e fotoperíodo foram controlados e padronizados para serem os mesmos do experimento com os organismos teste. Amostras da água com cada concentração foram analisadas em espectrofluorímetro em 0, 4, 24, 48 e 96 horas após a mistura. Dessa forma foi possível observar o comportamento dos compostos da FSA e a concentração desses compostos dentro dos períodos experimentais, permitindo conhecer a concentração de hidrocarbonetos aos quais os indivíduos estariam expostos no momento que fossem montados os experimentos com os Lambaris.

I.3.3.1– Determinação de Hidrocarbonetos Dissolvidos na Água Usando Extração Líquido-Líquido e Espectrofluorímetro

Preparo, Limpeza e Descontaminação da Vidraria

Limpeza e descontaminação com solventes:

- A vidraria foi inicialmente lavada com detergente Detertec-7-neutro a 10%, enxaguada com água corrente e lavada novamente 3 vezes com água deionizada, deixando o material secar fora de estufa. Após a secagem iniciou-se a descontaminação com solventes (para completa retirada de resíduos de compostos orgânicos que pudessem contaminar a amostra). A vidraria foi lavada 3X com acetona (PA), seguidos de outros 3 banhos com o hexano (ou outro solvente usado na extração). Após a descontaminação, a vidraria foi envolvida em papel alumínio.

IMPORTANTE: esse procedimento é para vidraria que não passa pela descontaminação na mufla, ou seja, funil, frasco de 1l e provetas.

Limpeza e descontaminação usando a mufla:

A mufla é um forno aquecido a 450°C onde são colocadas vidrarias para descontaminação. O aquecimento transforma compostos orgânicos em CO₂. Lavou-se a vidraria seguindo o procedimento acima, após secagem, a vidraria foi levada (balão de rotoevaporador, coluna, pipetas) à mufla permanecendo por 8 horas. Após o resfriamento da mesma, esta foi envolvida em papel alumínio.

Extração Dos Hidrocarbonetos Nas Amostras De Água:

Para amostras de 100 ml.

Extraiu-se 100 ml de água expostas a fração solúvel na água do petróleo, através da extração líquido-líquido. Para isso, utilizou-se:

- Funil de separação de 250 ml com tampa de vidro e torneira de teflon.
- Balão de rotoevaporador de 250 ou 150 ml.

Adicionou-se 10 ml de n-hexano na amostra de 100 ml de água. A amostra juntamente com n-hexano foi colocada num funil de extração. Iniciou-se a extração com agitação do funil durante 5 minutos. (IMPORTANTE: deve-se ter cuidado com o gás formado durante a extração, abrindo a torneira nos dois primeiros movimentos de agitação). Passados os 5 minutos de agitação, a solução (Amostra + hexano) ficou em repouso por 10 minutos, neste período a tampa do funil tem que ser mantida aberta. Nessa fase ocorreu a separação da água e do hexano. Os hidrocarbonetos permaneceram na fração de hexano, porque possuem afinidade pelo solvente. Essa separação foi observada através da densidade dos líquidos. A água é mais densa que o hexano, isso fez com que a água ficasse numa faixa inferior ao hexano no funil. Após os 10 minutos, retirou-se a água. Depois retirou-se o hexano, mantendo-o num balão de rotoevaporador. Repetiu-se esse procedimento mais duas vezes (total 3 vezes). Desta forma obteve-se o extrato, composto pelo hexano e hidrocarbonetos, mas ainda contendo um pouco de água.

Filtragem Através Da Coluna De Na₂SO₄

Material utilizado: Na₂SO₄ (Merck) descontaminado na mufla a 450°C por 8 horas ou overnight, mantido em dissecador ou estufa a 100°C.

Coluna de vidro (pode ser um funil pequeno).

Pipeta de Pasteur

Balão de rotoevaporador.

Obtido o extrato, este passou por uma coluna de Na₂SO₄ para a retirada completa da água. Para isso, colocou-se Na₂SO₄ na coluna de vidro (vedada com

algodão aproximadamente metade da coluna foi preenchida pelo sulfato de sódio). Com uma pipeta de Pasteur colocou-se o extrato e esperou-se a filtração. O extrato filtrado foi mantido num balão. Após a filtração (retenção da umidade), o extrato foi levado para o rotoevaporador.

Diminuição Do Volume No Rotoevaporador

Nesta etapa foi realizada uma diminuição do volume do extrato, mas sem alterar a composição de hidrocarbonetos original, para isso foi usado o rotoevaporador. Este equipamento tem como princípio funcional o aquecimento da amostra (banho-maria) num sistema a vácuo onde o solvente (n-hexano) evapora, mas os hidrocarbonetos são mantidos no extrato, diminuindo o volume sem alterar a amostra.

No rotoevaporador, o extrato foi aquecido no banho-maria e mantido no sistema à vácuo. Com o aquecimento, o hexano evaporou e passou por uma câmara resfriada, ocorrendo a precipitação do solvente, voltando ao estado líquido, sendo armazenado em um recipiente isolado. Deixou-se aproximadamente 1 ml de extrato, tomando cuidado para não secar a amostra.

Depois de passar pelo rotoevaporador o extrato foi guardado num frasco vedado. O balão que continha o extrato foi lavado com n-hexano e esse solvente foi adicionado ao extrato. Esse extrato pode ser armazenado em geladeira até o momento da leitura em espectrofluorímetro.

Padronização Das Amostras

Para padronizar o volume das amostras utilizou-se um balão volumétrico de 5 ml. Este balão foi lavado com n-hexano 10 vezes (para descontaminação) a cada aferição volumétrica. Após descontaminação, os extratos foram um a um transferidos para o balão de 5 ml. Após a transferência do extrato para o balão, o frasco onde estava o extrato foi lavado 3 vezes com n-hexano, e este solvente foi adicionado ao balão. Se caso exceder o volume de 5 ml, deve-se levar o balão com o extrato para um concentrador de nitrogênio, que fará o volume diminuir até o desejado. Se faltar extrato para completar 5 ml, adiciona n-hexano até completar o volume esperado. Terminada a aferição volumétrica, o extrato no balão foi homogeneizado com uma leve agitação, e este foi guardado num frasco vedado com fita de teflon.

Diluição

Os extratos amostrados nesse experimento passaram por uma diluição antes da leitura no espectrofluorímetro. Isto porque foi realizado um teste com uma das amostras e observou-se que a mesma apresentava uma concentração muito alta de hidrocarbonetos, extrapolando o limite de detecção do aparelho utilizado. A diluição para estas amostras foi de 1:10, ou seja, 1ml de extrato (5ml) em 10ml de solução (9 ml de hexano). Essa diluição foi realizada minutos antes da leitura.

Preparo Da Curva Padrão - Criseno

O Criseno é um dos hidrocarbonetos eleito mundialmente como padrão para se estabelecer a concentração de outros hidrocarbonetos. Assim possibilita a comparação com outros trabalhos. Este produto é extremamente cancerígeno, por isso deve-se tomar os cuidados adequados durante sua utilização.

A solução mãe foi preparada a uma concentração de 110 μ g/ml. A solução mãe, quando preparada, deve ser pesada, contando o peso do frasco, e esse dado deve ser anotado na etiqueta. Todas as vezes que for utilizar a solução-mãe, deve-se pesar novamente e conferir se o peso é o mesmo marcado na etiqueta. Caso seja um valor menor, adiciona-se hexano até atingir o peso anotado inicialmente. Isso deve-se ao fato do criseno ser volátil. Após pesar, prepara-se a seguinte diluição para a montagem da curva padrão: (usa-se seringas cromatográficas e balões volumétricos de 5 e 10 ml).

100 μ l pp/5 ml	2,2 μ g/ml (solução A)
100 μ l pp/10 mL	1,1 μ g/ml
50 μ l pp/ 10 mL	0,55 μ g/ml
25 μ l pp/10 mL	0,275 μ g/ml
20 μ l pp/5 mL	0,11 μ g/ml
100 μ l solução A/5 mL	0,044 μ g/ml
100 μ l solução A/ 10 mL	0,022 μ g/ml

Leitura No Espectrofluorímetro

Para leitura foi utilizado o espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-3.

O comprimento de onda: excitação - 310 nm e de emissão - 360 nm.

I. 3.4- Bioensaios

A outra fase do projeto foi submeter os organismos escolhidos para este estudo, à presença do contaminante.

Para isso, após aclimação de no mínimo 15 dias, os animais foram transferidos para o laboratório de Bioensaios no Departamento de Biologia Celular onde foram realizados os experimentos agudos com a duração de 96 horas. Vinte e dois (22) aquários (10l) foram montados com cinco (05) indivíduos em cada um deles, sendo quatro aquários para o controle (dois para o controle de 24 horas e dois para o de 96 horas), dois para os testes em cada uma das seguintes concentrações (15% FSA - 12, 24 e 96 horas; 33% FSA - 12, 24 e 96 horas e 50% FSA - 12, 24 e 96 horas) (Figura 2). A biomassa nos aquários foi controlada sendo constituída de 4,2g de peixe/l.

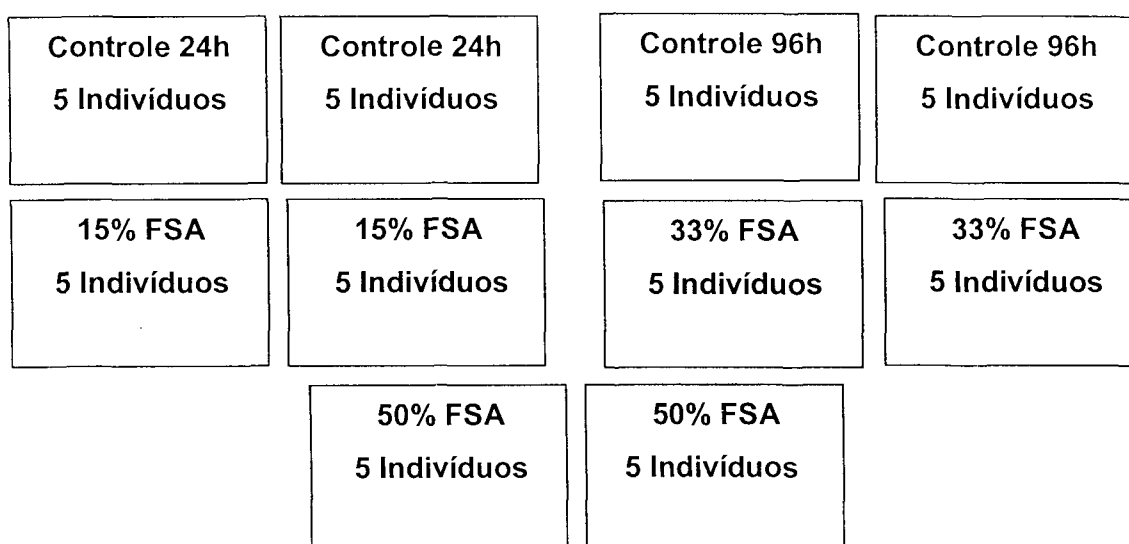


Figura 2 – Esquema demonstrando a distribuição dos indivíduos e as concentrações de Fração solúvel utilizada. Os aquários usados para cada diluição foram montados para cada tempo de exposição (12, 24 e 96 horas). E os controles foram montados apenas uma única vez.

As condições experimentais foram controladas de acordo com o período de aclimação como: temperatura (entre 22 e 24 °C), aeração constante, pH 6,8 - 7,0 e fotoperíodo (12 h/claro e 12 h/escuro). A aeração nos aquários durante a exposição foi reduzida para minimizar a evaporação dos hidrocarbonetos voláteis e os indivíduos foram alimentados uma única vez durante o período experimental de 96 horas. O experimento foi montado sob capela para evitar a exposição aos produtos voláteis as FSA.

Após o período de 12, 24 e 96 horas de exposição, dez indivíduos foram anestesiados em MS222 (0,002%) e sacrificados. Amostras do fígado e das

brânquias foram coletadas para estudo de histopatologia através de microscopia de luz e eletrônica (transmissão e varredura). Cinco amostras de fígado e dez do primeiro e segundo arcos branquiais de cada concentração e tempo foram preparados para microscopia de luz com fixação em ALFAC por 16 horas; cinco amostras de fígado foram fixadas para microscopia eletrônica de transmissão com fixação em microondas usando o fixador Karnoviski modificado. Dez amostras do segundo arco branquial esquerdo das brânquias foram fixadas em Glutaraldeído 3% e tampão cacodilato 0,1M para microscopia eletrônica de varredura. Além disso, 10 amostras de músculo foram coletadas e congeladas a -20°C , para posterior medida da atividade da acetilcolinesterase.

I. 3.4.1- Microscopia de Luz

Fixação

ALFAC (85 ml de Álcool 80%, 10ml de Formol 40%, 5ml de Ácido Acético Glacial adicionado momentos antes da fixação).

Desidratação

O material foi desidratado por uma bateria crescente de álcool 70%, 80%, e 90% e 95% durante 1:30h cada. O material passou quatro (2) vezes por álcool absoluto por 2h cada.

Diafanização

Três banhos de xilol, de 1:30h, 1h, e 15-20 min, respectivamente.

Inclusão

Dois banhos de 2h em Paraplast em estufa à 58°C , seguidos de emblocagem.

Trimagem

Os blocos foram aparados lateralmente, para facilitar o corte e para evitar a retração dos cortes. Esta moldagem foi realizada com o auxílio de uma lamparina e espátulas.

Microtomia

Após a trimagem, os blocos foram mantidos no freezer, para que a resina endurecesse, facilitando a obtenção dos cortes na microtomia. Os cortes foram feitos com uma espessura de $5\mu\text{m}$, distendidos em lâminas de vidro com auxílio de uma placa aquecedora. A albumina espalhada na superfície da lâmina facilita a fixação dos cortes na mesma, em seguida as lâminas foram levadas à estufa a 40°C por 15 minutos, para completar a fixação do cortes.

Coloração

Foi realizada a seguinte coloração:

- Hematoxilina e Eosina

As lâminas foram diafanizadas em Xilol, em seguida hidratadas em série decrescente de alcóois (100%, 90% e 70%). Após a hidratação, as lâminas permaneceram por 3 minutos e 3 minutos e 30 segundos na hematoxilina de Harris, para fígado e brânquias respectivamente, sendo posteriormente lavadas em água corrente por 5 minutos e coradas com eosina durante 3 minutos e 30 segundos para fígado e 4 minutos para brânquias. Ao término da coloração, as lâminas foram desidratadas em série crescente de álcoois (70%, 90% e 100%) e novamente diafanizadas em xilol I e II por 5 min e finalmente montadas com resina e lamínula.

As lâminas foram analisadas e as imagens foram registradas no Fotomicroscópio AXIOPHOT ZEISS do Setor de Ciências Biológicas/UFPR.

1.3.4.2- Fixação em Microondas para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fixador: Glutaraldeído 1%

Paraformaldeído 2%

Tampão cacodilato 0,1M

CaCl₂ 5mM

pH 7,2-7,4

Uso do microondas:

Preparação dos blocos de ágar (para calibrar microondas):

2g de ágar em 100 ml de solução salina 0,9% (0,9g de NaCl em 100 ml de água). A solução foi aquecida no microondas (não permitir a presença de granulações). Adicionou-se 0,5 ml de Giemsa (Sigma) no ágar e a solução foi misturada utilizando um agitador magnético. Após corada, a mistura foi despejada em formas de emblocagem para microscopia eletrônica, deixando endurecer na geladeira. Os blocos de ágar foram conservados na geladeira em solução tampão cacodilato 0,05M (para evitar contaminação da solução).

Marcação do lugar de incidência das microondas:

Foi usado um microondas com um prato interno não giratório, neste foi colocado papel toalha umedecido na extensão total da parte interna do microondas.

O mesmo foi ligado em potência total por 2 min, em seguida verificou-se as áreas que se encontravam secas e estas foram marcadas com caneta esfereográfica.

Calibragem e Teste de tempo de permanência:

Uma pequena quantidade do fixador utilizado para as amostras e um bloco de ágar foram colocados em uma placa de petri. A placa foi colocada no microondas no local aquecido e marcado anteriormente. Ligou-se o microondas por 5 Seg. (+ ou -). E foi observado o aspecto da cor do bloco. Quando o bloco permanecia intacto (sem desmanchar) e passando a ter uma cor mais azulada era demonstração que o tempo utilizado era ideal para as amostras. Quando o bloco desmanchava e/ou a cor mudava, era preciso diminuir o tempo até alcançar o tempo ideal. Se a cor não estiver homogênea o tempo poderá ser aumentado sempre em 1 ou 2 seg de diferença. Após a fixação as amostras foram mantidas em Cacodilato.

Para o fígado a fixação teve um tempo médio de 3 segundos. Esse tempo varia de acordo com a calibragem do microondas que deve ser verificada diariamente antes de iniciar o processo de fixação.

1.3.4.3- Preparo do material para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Lavagem

Utilizou-se o tampão cacodilato (0,1M) em três banhos de 10min cada, para retirar o excesso do fixador.

Pós - fixação

Utilizou-se tetróxido de ósmio 1,0% durante 1 hora no escuro; se o material não ficar negro, deixa-se por mais 30 minutos.

Lavagem

Lavou-se o material 2 vezes (10min cada) com tampão cacodilato 0,1M, para retirar o excesso de ósmio.

Uranila em bloco 2% (1 hora)

- acetato de uranila
- água destilada

Para uranila 2%: Pesar 2g de acetato de uranila em um enlemeyer e colocar 50 ml de DH_2O , misturar a solução usando agitador magnético, passar para um balão volumétrico de 100 ml e completar com água destilada, Homogeneizar bem. Deve-se ter muito cuidado ao preparar essa solução (manuseio em capela, usando máscara e luvas), a uranila possui uma certa radioatividade (baixa, mas merece cuidados). A uranila pode ser preparada com metanol ou etanol.

Desidratação

O material foi banhado com ethanol 70%, 90%, 95%, 100% e 100%, duas vezes (10min cada); em seguida colocado em óxido de propileno por 10min.

Inclusão

Em resina PoliEMBED12.

Óxido de propileno + Resina (2:1) → 12 horas

Óxido de propileno + Resina (1:1) → 10 horas

Óxido de propileno + Resina (1:2) → 24 horas

Resina pura → 8 horas

Emblocagem

O material e a resina foram colocados nos moldes.

Polimerização

Os moldes permaneceram em estufa a 68 °C durante 12 horas

Trimagem

Foi feita sob a lupa usando lâmina de aço.

Ultramicrotomia

Os cortes foram obtidos com espessura de 60 nm.

Contrastção

A contrastção foi realizada em duas etapas.

Preparo da Uranila 5%:O mesmo procedimento para 2 % (5g de uranila para 100 ml de solução)

A uranila 5% é usada para a contrastção das telas já contendo material.

As telas foram contrastadas em acetato de uranila 5%, previamente filtrado, durante 30 minutos, em seguida foram lavadas 3 vezes em água destilada e secas por 10 a 30 minutos sobre papel filtro.

Na segunda etapa, as telas foram contrastadas em citrato de chumbo (Reinolds, 1963) por 10 minutos, sendo posteriormente lavadas e secas da mesma forma que para uranila.

Com o término da contrastação do material, este foi levado ao Microscópio Eletrônico de Transmissão do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, para observação e registro no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL 1200 EXII.

I.3.4.4- Preparo para Microscopia Eletrônica de Varredura

O segundo arco branquial esquerdo foi coletado e fixado em glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 1M, pH 7,2-7,4 por 24 horas. Em seguida foi desidratado em bateria crescente de solução etanol, passando posteriormente pelo ponto crítico em CO₂ líquido e metalização em ouro. A análise das amostras foi realizada no microscópio EM Philips 500 do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

I.3.4.5- Atividade da Acetilcolinesterase

Todas as etapas dessa metodologia foram desenvolvidas no laboratório de Toxicologia Ambiental no Departamento de Farmacologia sob a orientação da Profa. Dra. Helena Cristina da Silva Assis. As amostras de músculo foram descongeladas sob gelo moído e pesadas, tendo cada uma delas aproximadamente 200 mg. Estas amostras foram então homogeneizadas em 2 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e mantidos sempre em gelo. Os homogenatos foram então transferidos para ependorfes de 2 ml e centrifugados por 10 minutos, a 4°C e a 10 000 g. O sobrenadante foi estocado em novos ependorfes e congelados a -20° C para análises posteriores.

As amostras de sobrenadante foram diluídas (1:10 ou 10% v/v) em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. Após a diluição, cada amostra foi pipetada em 4 réplicas de 50µl sobre microplaca de leitura em espectrofotômetro. O sobrenadante foi novamente congelado para posterior quantificação protéica (proteína total) pelo método de BRADFORD (1976).

Todas as absorbâncias consideradas para cada amostra de músculo, inclusive na quantificação protéica, foram as médias de no mínimo três valores: a quadruplicata analítica permite que um dos valores, o mais distante da média, seja desconsiderado no caso de erro de pipetagem. Foi usado o espectrofotômetro Sunrise - TECAN para as leituras.

Na microplaca foi adicionado 200µl de DTNB a 0,75mM sobre cada alíquota, seguidos de 50µl de iodeto de acetilticolina a 9mM. O substrato foi adicionado somente pouco antes das leituras em espectrofotômetro. O produto da reação tem um pico máximo de absorção em 415 nm de comprimento de onda. Dois brancos

com tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) substituíram o sobrenadante diluído, sendo lidos junto com as amostras. A média dos valores de absorbância dos brancos foi subtraída do valor médio de cada amostra. As leituras foram de seis ciclos de 30 segundos (total 2 min e 20 Seg) para cinética enzimática: a relação linear da absorbância em função do tempo. Obtém-se um delta de absorbância para cada amostra: o valor no tempo (6') subtraído do valor no tempo (1') e o resultado dividido por 5 (intervalos de tempo).

Para a quantificação protéica (BRADFORD, 1976) utilizou-se a diluição de 1:10 de sobrenadante em tampão fosfato 0,1M pH 7,5. A microplaca recebeu as amostras (10 µl) de sobrenadante diluído, o reagente de Bradford (Bio Rad®) foi pipetado sobre cada amostra (250 µl) e a leitura deu-se com o filtro para 595 nm. Os valores finais da quantificação protéica colorimétrica foram obtidos em mg de proteína por ml de amostra. Para tal, sobrepõe-se os valores de absorbância lidos nas amostras aos valores de absorbância de uma curva pré-estabelecida, utilizando albumina de soro bovino, lidas também a 595 nm.

Os valores finais da quantificação colinesterásica são dados pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \{[A \times (t \times \varepsilon \times d)^{-1}] \times [1 \times (1 \times D)^{-1}] \times [1 \times (\varepsilon \times d)]\} \times [Pt]^{-1}$$

Cuja unidade é $\eta\text{mol TIOCOLINA} / \text{minuto} / \text{mg de proteína}$ e onde:

A = absorbância de cada ensaio menos absorbância dos brancos, a 415 nm;

t = tempo;

D = fator de diluição das amostras, ou volume final na microplaca/volume de amostra de sobrenadante $\times 10 = 300 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l} \times 10 = 60$;

ε = coeficiente de extinção nanomolar para o reagente de cor (DTNB) =

$$= 1,36 \times 10^4 \text{ml} \times \eta\text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1};$$

d = diâmetro da cavidade na microplaca = 0,9 cm;

[Pt] = concentração de proteína nas amostras (em mg/ml).

I.3.4.6 – Tratamento Estatístico

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com a análise não paramétrica de variância a um critério, para comparação entre as médias dos grupos (controles, 15% FSA- 12h, 33%FSA – 12h, 50%FSA - 12h, 15%FSA – 24h, 33%FSA – 24h, 50%FSA – 24h, 15%FSA – 96h, 33%FSA – 96h, 50%FSA- 96h) seguida de Bonferroni, para comparações múltiplas entre os grupos, ambos os testes com um

nível crítico de significância de 5%. Para tal foi usado o programa GraphPad Prism[®], v.3.00, © 1994-1999 para as análises.

I. 4- RESULTADOS

Os exemplares da espécie *Astyanax sp.* expostos à fração solúvel do petróleo neste trabalho, apresentaram consideráveis danos nos tecidos analisados durante os três períodos de exposição testados (12, 24 e 96 horas). Estes efeitos a nível morfológico e também os dados da atividade da acetilcolinesterase são apresentados abaixo:

I.4.1- Mortalidade

Durante o experimento foi observada uma mortalidade baixa, mantida dentro dos índices aceitáveis para experimento com organismos vivos provenientes de coletas em ambientes naturais e utilizados em laboratórios (10%). A mortalidade ocorreu apenas no período de exposição de 96 horas, com um total de 12,5% indivíduos mortos para as três diferentes concentrações, onde um indivíduo fazia parte do grupo controle, 2 do grupo exposto a 15% de FSA, 1 do grupo de 33% de FSA e 1 estava no grupo exposto a 50% de FSA do petróleo (Figura 3).

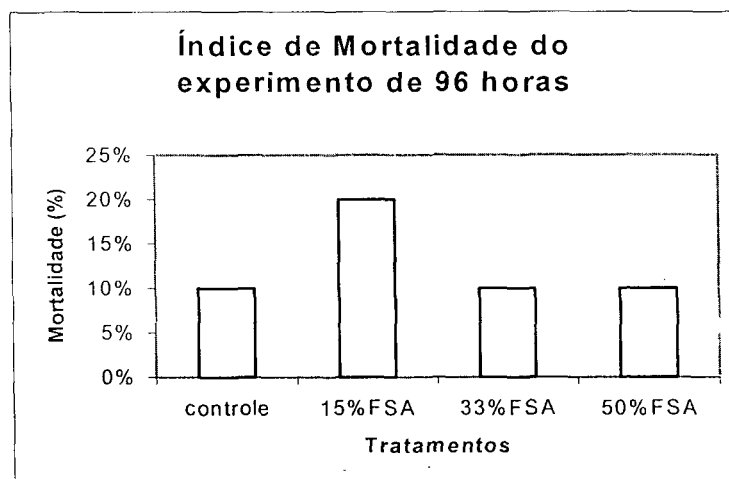


Figura 3- Índice de mortalidade, em porcentagem, dos indivíduos expostos a 15%, 33% e 50% de FSA do petróleo e controle durante 96 horas de experimento.

I.4.2- Análise Química da Água Exposta a FSA do Petróleo.

A fração solúvel do petróleo na água (FSA) ou dos seus derivados é composta principalmente de hidrocarbonetos de cadeias curtas, policíclicos aromáticos e heterocíclicos (Anderson *et al.*, 1974; Mackay & Shiu, 1976). A técnica de espectrofluorimetria possibilitou conhecer a concentração total de hidrocarbonetos presentes na água para as três diluições utilizadas (15%, 33% e 50% de FSA) em diferentes tempos de exposição, demonstrando ser uma eficiente metodologia para o objetivo deste trabalho.

Os dados obtidos demonstraram uma maior volatilização dos hidrocarbonetos durante as primeiras horas de exposição (4 e 24 horas), chegando a uma diferença de 30 a 40% de perda entre um tempo amostral e o tempo seguinte, mas a volatilização também ocorreu nos últimos tempos de amostragem (Tabela 1), demonstrando que durante 96 horas, os compostos da fração solúvel estão em processo de evaporação, mas também apresentam toxicidade, como pode ser observado nos resultados morfológicos e neurotóxicos.

Analisando a Tabela 1 e a Figura 4, observa-se que 4 horas após a exposição houve uma pequena diminuição na concentração de hidrocarbonetos (16%) na água exposta a 15% de FSA do petróleo. Enquanto que na água exposta a 33% e 50% nesse mesmo período de exposição houve uma perda da concentração de hidrocarbonetos da água (volatilização e/ou adsorção) de 31% e 49% respectivamente (Tabela 1, Figuras 5 e 6).

Na água exposta às três diferentes concentrações após 24 horas, houve uma diminuição (aproximadamente 50 - 60%) na concentração total de hidrocarbonetos em ambas as amostras (Tabela 1, Gráfico 4, 5 e 6).

Entre o período de 24 e 48 horas, houve uma certa inversão nas concentrações (Tabela 1), ao invés de diminuir a concentração de hidrocarbonetos no período amostral de 48 h em relação a de 24h, ocorreu um aumento na concentração nas amostras de 33% e 50% de FSA (Gráficos 5 e 6). Esse intervalo entre 24 e 48 horas parece ser um período de transição, onde ocorre uma maior perda de hidrocarbonetos ou através da volatilização ou por adsorção ao vidro e cola de silicone dos aquários, mas não pode-se afirmar quais foram os meios de diminuição da concentração dos hidrocarbonetos. A inversão nas concentrações também pode ser resultado de algum erro durante o preparo para a leitura em espectrofluorímetro, está hipótese foi levantada porque essa inversão de

concentração de hidrocarbonetos não foi observada na água exposta a 15% de FSA, nesse mesmo período amostral.

Após 96 horas de exposição foi observado uma redução brusca na concentração dos hidrocarbonetos tanto para as amostras de água expostas a 15% de FSA (87%), quanto para as de 33% (74%) e 50% FSA (69%). Comparando com a concentração inicial (tempo 0), restou apenas 20 a 30% da concentração total de hidrocarbonetos para cada uma das três diluições. Estes resultados demonstraram que os hidrocarbonetos que compõem a FSA do petróleo são realmente voláteis, como descrito na literatura (Brauner *et al.*, 1999).

Estes dados juntamente com os resultados histopatológicos que serão descritos a seguir, demonstram que apesar dos compostos da fração solúvel serem altamente voláteis, estes também são responsáveis por efeitos tóxicos em órgão e tecidos de teleósteos dulcícolas.

Tabela 01 - Análise química de hidrocarbonetos na água contendo a fração solúvel do petróleo (FSA) em diferentes concentrações (15%, 33% e 50%).

Tempo de exposição (horas)	Concentração de hidrocarbonetos ($\mu\text{g L}^{-1}$) 1) 15% de FSA do petróleo	Concentração de hidrocarbonetos ($\mu\text{g L}^{-1}$) 1) 33% de FSA do petróleo	Concentração de hidrocarbonetos ($\mu\text{g L}^{-1}$) 1) 50% de FSA do petróleo
0	344,30 (+100%)	491,98 (+100%)	811,12 (+100%)
4	285,95 (-16%)	338,22 (-31%)	407,36 (-49%)
24	164,27 (-52%)	203,54 (-58%)	513,27 (-36%)
48	129,42 (-63%)	226,49 (-53%)	431,14 (-46%)
96	46,46 (-87%)	127,77 (-74%)	245,02 (-69%)

* Os valores encontrados dentro dos parênteses, demonstram a concentração total em % e o sinal (+) refere-se a concentração original no Tempo 0 e o sinal (-) refere-se ao quanto foi perdido durante os períodos amostrais a partir do Tempo 0.

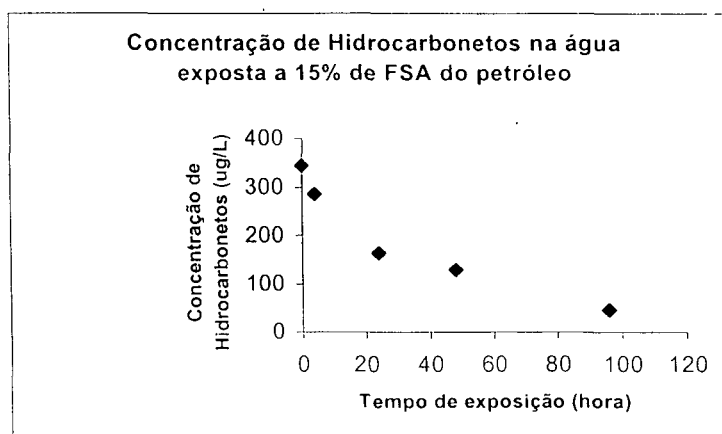


Figura 4 - Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 15% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96 h. Amostras coletadas em 0h, 4h, 24h, 48h e 96h após a contaminação.

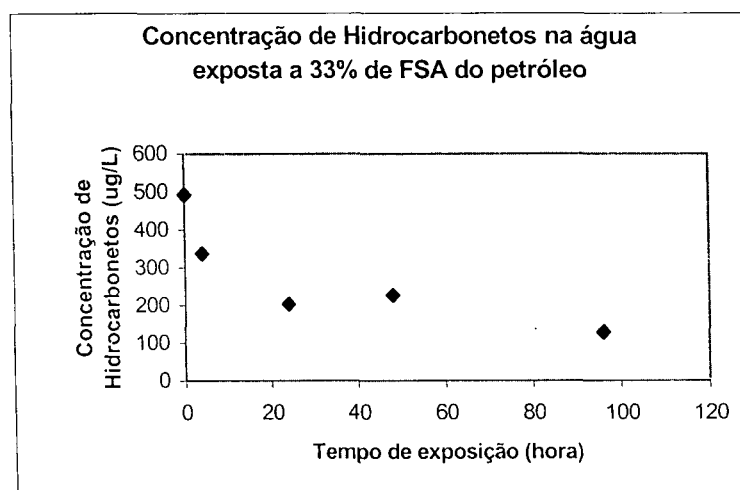


Figura 5 - Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 33% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96h. Amostras coletadas em 0h, 4h, 24h, 48h e 96h após a contaminação.

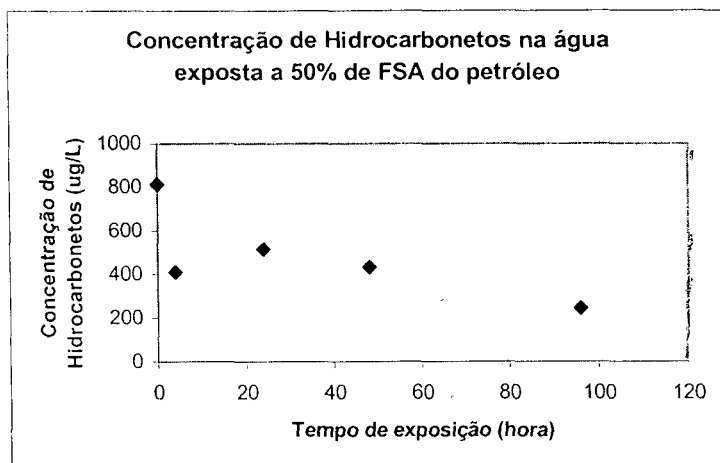


Figura 6 - Concentração dos hidrocarbonetos na água contaminada com 50% de fração solúvel do petróleo na água (FSA) durante o período de 96h. Amostras coletadas em 0h, 4h, 24h, 48h e 96h após a contaminação.

I. 4.3- Histopatologia

As análises histopatológicas de fígado e brânquias realizadas demonstraram que a fração solúvel do petróleo nas diferentes diluições testadas causam alterações que podem comprometer o funcionamento desses órgãos, assim como a resposta dos indivíduos frente as variações ambientais e fisiológicas a que estão submetidos. Os resultados são apresentados em forma de tabela e registro fotográfico. Na tabela constam as lesões observadas, assim como o número de indivíduos que apresentaram as lesões. Pode-se dizer que esta análise é qualitativa e semi-quantitativa, isto porque não foi analisado o órgão inteiro e por isso não foi possível quantificar a frequência das lesões em cada indivíduo, mas foi analisado em quantos indivíduos apareceram tais lesões (prevalência). Os registros fotográficos demonstram as alterações mais relevantes e evidentes nos tecidos estudados.

Fígado

As amostras de fígado dos indivíduos do grupo controle 24 horas e 96 horas apresentaram-se bem preservadas, com arranjo e estruturas características do tecido hepático descrito na literatura (Groman, 1982; Takashima, F & Hibiya, T, 1995). Os hepatócitos apresentaram um formato poliedral, núcleo arredondado, basófilo, polinucleolar e com limite entre as células bem definido (Figura 7). Muitos

sinusóides com hemácias bem preservadas e tecido pancreático ao redor dos vasos sangüíneos foram observados entre os hepatócitos. Em algumas amostras foi evidenciado uma cápsula de tecido fibroconectivo ao redor do fígado e células biliares epiteliais formando os ductos biliares. Próximo aos vasos sangüíneos e rodeados por tecido pancreático foram encontradas células pequenas e arredondadas com citoplasma bem acidófilo e com um núcleo redondo e basófilo, que aparentam ser parasitas. No entanto, não foi realizada nenhuma investigação a respeito dessas células, pois para este estudo o aparecimento desses prováveis parasitas não é um fator importante na avaliação dos efeitos tóxicos da FSA, visto que esses organismos provavelmente já parasitavam os indivíduos estudados antes do início deste experimento.

Brânquias

O padrão de constituição morfológico das brânquias descrito na literatura (Morrison, 1989) foi o mesmo observado nas brânquias de *Astyanax sp.* do grupo controle (24 horas). As brânquias desses teleósteos, de uma forma geral apresentaram-se bem fixadas e são constituídas por lamelas primárias e secundárias. As lamelas secundárias constituem-se de duas camadas epiteliais ao redor de um capilar central (Figura 11). Este capilar central é suportado pelas células pilares. Em algumas lamelas foi observado células mucosas entre as células epiteliais. Algumas espécies apresentam células de cloreto, mas em *Astyanax sp.* não foi encontrado este tipo de célula.

As brânquias do grupo controle 96 horas apresentaram um aumento da vascularização nas lamelas secundárias, isto pode ter acontecido como uma forma de compensar a diminuição na ventilação dos aquários após as 96 horas. Essa baixa oxigenação deve-se ao fato de que o grupo controle foi submetido as mesmas condições dos grupos expostos ao contaminante, e como o xenobionte usado é extremamente volátil foi estabelecido uma aeração reduzida para evitar a perda dos compostos durante o tempo de exposição. Acredita-se que o aparecimento dessa alteração apenas nesse grupo controle e não no grupo controle de 24 horas, deve-se ao tempo que os indivíduos foram mantidos num ambiente de baixa oxigenação.

Efeitos Histopatológicos da FSA (diluição 15%)

Fígado

Os indivíduos expostos a 15% de FSA do petróleo apresentaram nos seus tecidos hepáticos alterações de níveis variados, desde mais simples e menos

severos, até lesões que podem levar ao comprometimento do órgão. Nos três períodos amostrados foi observado o desaparecimento do limite celular do hepatócitos, necroses e micronecroses, se comparado com o controle. Além disso, foi observado nos indivíduos amostrados 12 horas após a exposição, que os hepatócitos apresentaram um citoplasma mais denso e homogêneo (Figura 7), sem a distinção de regiões basofílicas como retículo endoplasmático granular, que é bem visível em células saudáveis. Nos indivíduos amostrados após 96 horas de exposição foi encontrado entre os hepatócitos um aglomerado de células distintas do restante do tecido, e através das suas características como a presença de granulação no citoplasma, foram diagnosticadas como melanomacrófagos (Figura 7).

Entre as lesões encontradas nos indivíduos em todos os tempos amostrais, foi evidenciado que o desaparecimento do limite celular dos hepatócitos teve uma maior ocorrência nos indivíduos amostrados após 24 e 96 horas de exposição (Tabela 02 e Figura 7). Já as necroses e micronecroses ocorreram em maior proporção para os indivíduos amostrados após 96h (Tabela 02 e Figura 7). Os indivíduos desse grupo também apresentaram os supostos parasitas no fígado após 12, 24 e 96 horas de exposição. Este aspecto não pode ser relacionado com a exposição, como explicado acima para grupo controle.

Brânquias

Os indivíduos expostos a 15% da FSA apresentaram algumas lesões branquiais comuns nos tempos de 12 e 24 h (Tabela 2). Entre essas alterações foram observados aneurismas (Figura 11), que são descritos como uma dilatação dos vasos sanguíneos nas lamelas secundárias, acumulando células sanguíneas nas extremidades das lamelas.

Uma lesão observada nas brânquias dos indivíduos expostos aos três diferentes tempos (12, 24 e 96h) foi a desorganização do epitélio das lamelas secundárias, apresentando um descolamento do epitélio e desestruturação do capilar central, tendo como resultado a deformação das lamelas secundárias (Figura 11). Estas alterações podem comprometer a captação e distribuição do oxigênio nas brânquias.

Nos grupos de 24 e 96 horas foram encontrados parasitas, mas estes não podem ser usados como bioindicador de deficiência imune neste estudo, por se tratar de um bioensaio de exposição aguda e não um monitoramento ambiental. No

caso de biomonitoramentos, a presença de parasitas nas brânquias podem ser um importante bioindicador de aspectos ecológicos e de deficiência imune. Além dos parasitas, o grupo de 96 horas de exposição a FSA do petróleo apresentaram uma proliferação celular observada entre lamelas secundárias (Figura 11). Em quase 80% dos indivíduos que apresentaram essa proliferação celular foi observada uma desorganização das lamelas secundárias acompanhando essa lesão.

Efeitos Histopatológicos da FSA (diluição 33%)

Fígado

Os indivíduos expostos a 33% da FSA durante 12, 24 e 96 horas apresentaram alterações bem semelhantes às observadas nos indivíduos expostos a 15% de FSA, ou seja, desaparecimento do limite celular dos hepatócitos, necroses e micronecroses, supostos parasitos, citoplasma dos hepatócitos mais denso e homogêneo. E além dessas lesões, observou-se o aparecimento de grupos de células acidófilas em determinadas regiões do tecido hepático, mas foi um resultado destacado apenas para poucos indivíduos.

O desaparecimento do limite celular dos hepatócitos foi evidenciado com uma alta frequência nos indivíduos dos três períodos amostrais (Tabela 02 e Figura 8). Nos indivíduos expostos a 12h não foi observada micronecrose, mas foi encontrado regiões necróticas. Enquanto que nos indivíduos expostos a 24 e 96 horas foi observado necroses e micronecroses em maior proporção que nos indivíduos expostos a 12 h (Tabela 02 e Figura 8). Estas alterações comprometem seriamente o funcionamento do fígado, podendo diminuir sua função de armazenamento, catabolismo e detoxificação, tornando os indivíduos mais frágeis a presença de outros xenobiontes e deficientes energeticamente. Estas deficiências são consequências da diminuição do número de hepatócitos saudáveis.

Os supostos parasitos ao redor dos vasos sanguíneos ocorreram nos indivíduos amostrados nos três tempos, como observado no grupo exposto a 15% FSA. No grupo de indivíduos expostos a 12 h, o citoplasma dos hepatócitos apresentou-se mais denso se comparado com os hepatócitos dos indivíduos do grupo controle (Tabela 02 e Figura 8).

Brânquias

As lesões encontradas nos indivíduos expostos a 33% de FSA do petróleo foram semelhantes entre os três diferentes tempos de exposição (12, 24 e 96 horas)

nas brânquias analisadas. Em ambos os grupos foram encontrados parasitos, mas assim como nos indivíduos expostos a 15% da FSA do petróleo, estes organismos não podem ser considerados indicadores de toxicidade. Outra lesão observada, foi a proliferação celular (Figura 12) já descrita acima para os indivíduos expostos a 15% da FSA do petróleo. Esta alteração pode prejudicar a captação de oxigênio nas lamelas secundárias, comprometendo a fisiologia de todas as células que compõem os diferentes órgãos dos indivíduos afetados. Juntamente com a proliferação celular, foi observado o desarranjo das lamelas secundárias nos indivíduos dos três diferentes tempos de exposição (Figura 12). Lamelas secundárias com aneurisma foram encontradas nos indivíduos amostrados em 12, 24 e 96 horas após contaminação.

As lesões branquiais observadas nos indivíduos expostos a 33% da FSA ocorreram numa proporção de indivíduos similar para todos os tempos amostrados (Tabela 2).

Efeitos Histopatológicos da FSA (diluição 50%)

Fígado

Assim como na exposição a 33% de FSA do petróleo, a exposição a 50% de FSA apresentou as mesmas alterações observadas na exposição a 15%. A principal diferença entre as 3 concentrações foi a ocorrência dessas alterações nos diferentes períodos amostrais.

Tanto em 12, 24 quanto em 96 horas foi observado o desaparecimento do limite celular dos hepatócitos e regiões necrosadas com alta frequência (Tabela 2 e Figura 8). As micronecroses foram evidenciadas apenas nos indivíduos expostos durante 96 horas.

Os hepatócitos dos indivíduos expostos durante 12 e 96 horas apresentaram seus citoplasmas mais densos e homogêneos. Esta alteração também foi observada nos indivíduos expostos durante 24h, mas houve uma menor prevalência (Tabela 02).

Os grupos de melanomacrófagos observados nos indivíduos expostos a 15% também foram encontrados nos indivíduos expostos a 50% de FSA (Figura 8), ocorrendo com alta incidência em todos indivíduos amostrados nos 3 diferentes tempos (Tabela 02).

A diluição de 50% da FSA demonstrou ser a mais tóxica para o fígado da espécie *Astyanax sp.*, isto pode ser evidenciado através das lesões observadas nos indivíduos expostos a essa diluição.

Brânquias

As brânquias dos indivíduos expostos a 50% FSA apresentaram as mesmas alterações observadas nas brânquias dos indivíduos expostos a 33% FSA para os três diferentes tempos amostrais (12, 24 e 96h) (Tabela 2).

A proliferação celular muitas vezes acompanhada do desarranjo do epitélio da lamela secundária também foi evidenciada (Figura 12), mas nesses indivíduos essas alterações apareceram separadamente e em alta incidência. Aneurismas também foram observados nos indivíduos amostrados em 12, 24 e 96 horas.

Tabela 2 - Resumo das lesões de fígado e brânquias em *Astyanax sp.* depois da exposição aguda à FSA do petróleo.

		Controle		15% FSA			33% FSA			50% FSA		
Tempo de Exposição (Horas)		24	96	12	24	96	12	24	96	12	24	96
Lesões Hepáticas												
Necrose		-	-	+	++	+++	+	+++	++++	++++	++++	++++
Parasitas		+	++	+++	+++	++	++	+	++	+	+	+
Perda de limite celular		-	-		+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++
Citoplasma denso		-	-	+			++			++++	++	+++
Melanomacrófago		-	-			+				+++	++++	++
Lesões Branquiais												
Aneurismas		-	-	+	++		++	+++	+++	+++	++++	++++
Desorganização da lamela secundária		-	-	+	+	++	+++	+++	+++	++++	+++	++++
Proliferação Celular		-	-			++	+++	+++	+++	++	+++	++

* (-) Representa a ausência de lesões e (+) representa 25% do total de indivíduos estudado com as lesões

I. 4.4- Microscopia Eletrônica de Varredura

Efeitos Histopatológicos da FSA (diluições 15, 33 e 50%) em Brânquias

O estudo dos efeitos tóxicos da FSA do petróleo a nível estrutural das brânquias corroboraram com os resultados obtidos na histopatologia.

Os indivíduos controle apresentaram brânquias com lamelas primárias e secundárias bem definidas e a superfície epitelial bem organizada (Figura 13).

Assim, como na microscopia de luz, na microscopia eletrônica de varredura foi observado uma proliferação celular entre as lamelas secundárias, aneurismas nas extremidades das lamelas secundárias e desorganização do epitélio lamelar nos indivíduos expostos às três diferentes concentrações (15%, 33% e 50% de FSA) e nos três tempos de exposição (12, 24 e 96 horas) (Figura 13).

I. 4.5- Microscopia Eletrônica de Transmissão

Efeitos Ultraestruturais da FSA (diluições 15, 33 e 50%) em Fígado

As análises ultraestruturais do fígado também confirmaram as alterações observadas no estudo histopatológico deste órgão. Foram observadas necroses, citoplasma denso com uma alta quantidade de retículo endoplasmático liso e diminuição na quantidade de outras organelas (Figura 9). Além dessas alterações que também foram observadas na microscopia de luz, os resultados das análises ultraestruturais revelaram a incidência de morte celular em vários indivíduos de todos os grupos testados. Os aspectos morfológicos das figuras de morte celular demonstram ser uma morte celular do tipo apoptótica, com condensação de cromatina, formato celular e nuclear irregular, algumas regiões eletrodensas dentro do citoplasma e em algumas células também foram observadas vacúolos autofágicos (Figura 10).

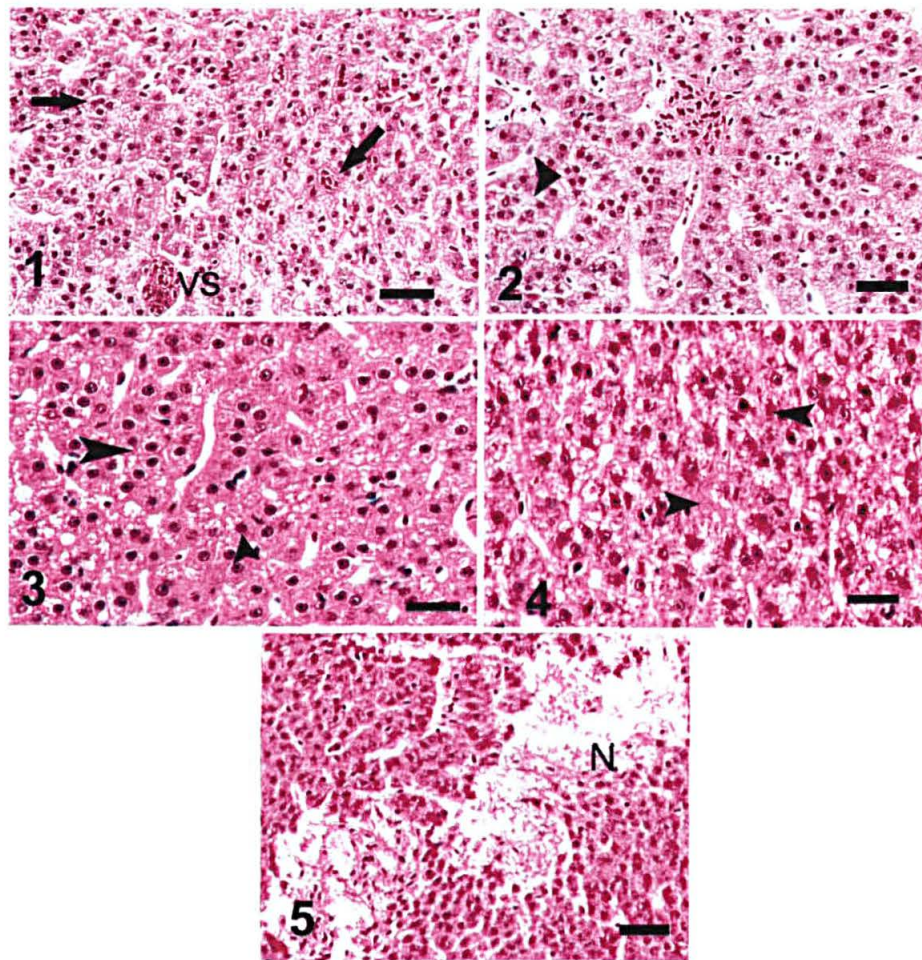


Figura 7- Fígado de *Astyanax sp.*, corado com Hematoxilina e eosina. Cortes de 5 μ m de espessura. 1- Controle 96 horas. Vasos Sangüíneos (VS) e hepatócitos com limite celular bem visível e núcleo (setas). Tarja = 25 μ m. 2- Controle 96 horas. Citoplasma homogêneo, mas com limite celular bem definido (ponta de seta). Tarja = 25 μ m. 3- Exposição a 15%FSA - 12h. Citoplasma homogêneo e perda do limite celular (ponta de seta). Tarja = 15 μ m. 4- Exposição a 15% FSA - 24h. Citoplasma menos homogêneo, células completamente sem limite celular (ponta de seta) Tarja = 15 μ m. 5- Exposição a 15% FSA 96h. Grande área necrótica (N), Tarja = 15 μ m.

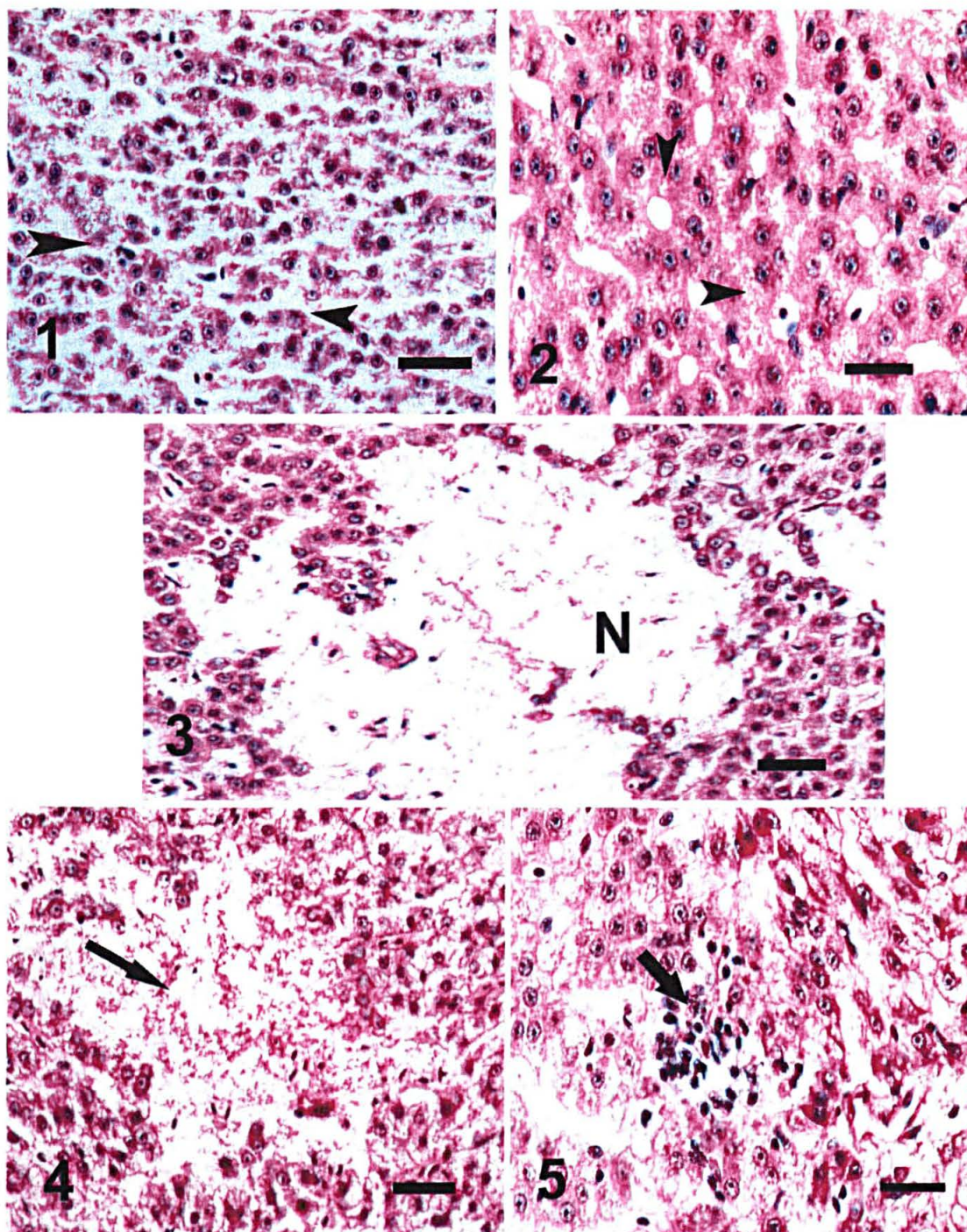


Figura 8- Fígado de *Astyanax* sp. Corado com hematoxilina e eosina. Cortes com 5 μ m de espessura. 1- Exposição a 33%FSA - 12h. Perda do limite celular (ponta de seta). Tarja = 15 μ m. 2- Exposição a 33% FSA - 96 h. Perda do limite entre as células e citoplasma denso (pontas de seta). Tarja = 15 μ m. 3- Exposição a 33% - 24h. Área necrótica (N). Tarja = 25 μ m. 4- Exposição a 50% FSA - 12h. Necrose (seta). Tarja = 25 μ m. 5 - Exposição a 50% FSA - 24h. Desorganização do citoplasma dos hepatócitos e aparecimento de pequeno centro de melanomacrofago (Seta).Tarja = 15 μ m.

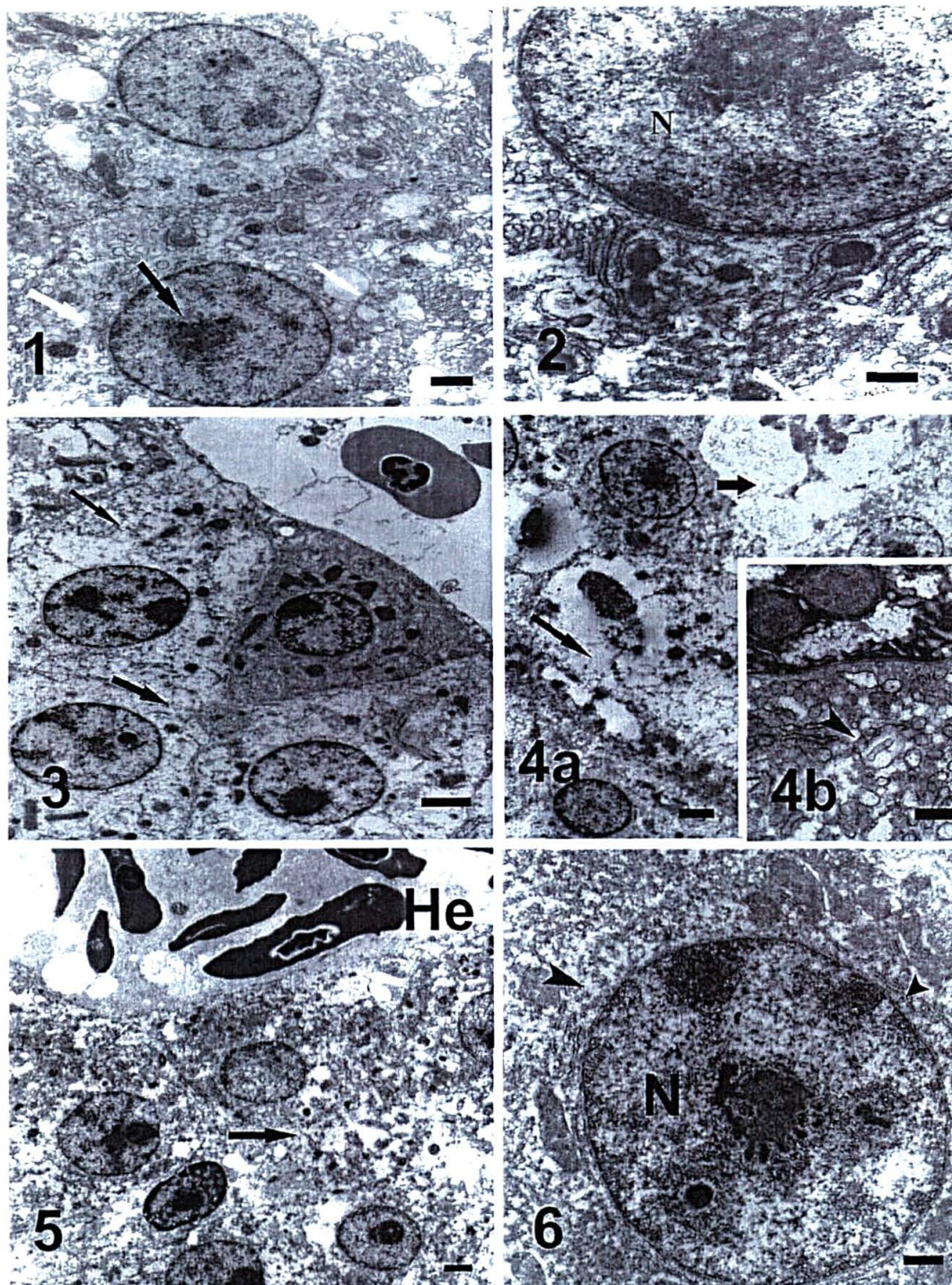


Figura 9- Alterações ultraestruturais (MET) em Fígado de *Astyanax* sp.
 1- Exposição a 15% FSA - 24h. Núcleo bem preservado (seta preta), mas observe uma diminuição na quantidade de organelas espalhadas no citoplasma (setas brancas). Tarja = 1 μ m. 2- Exposição a 15%FSA - 24h. Observe em maior aumento a diminuição de organelas dispersas no citoplasma (seta branca). Tarja = 500nm. 3- Exposição a 33% FSA - Observe novamente a menor quantidade de organelas no citoplasma (setas). Tarja= 2 μ m. 4a e b- Exposição a 33% FSA - 96h. 4a - Observe regiões com necrose (setas). Tarja = 2 μ m). 4b- Observe a formação de vesículas e o desarranjo no citoplasma (ponta de seta). Tarja = 200nm. 5 e 6 - Exposição a 50% FSA - 96h. 5- Observe diminuição bem expressiva da quantidade de organelas. Tarja = 2 μ m. 6- Vista em maior aumento. Observe o desarranjo do citoplasma e o aumento de retículo endoplasmático liso (ponta de seta). Tarja = 500nm.

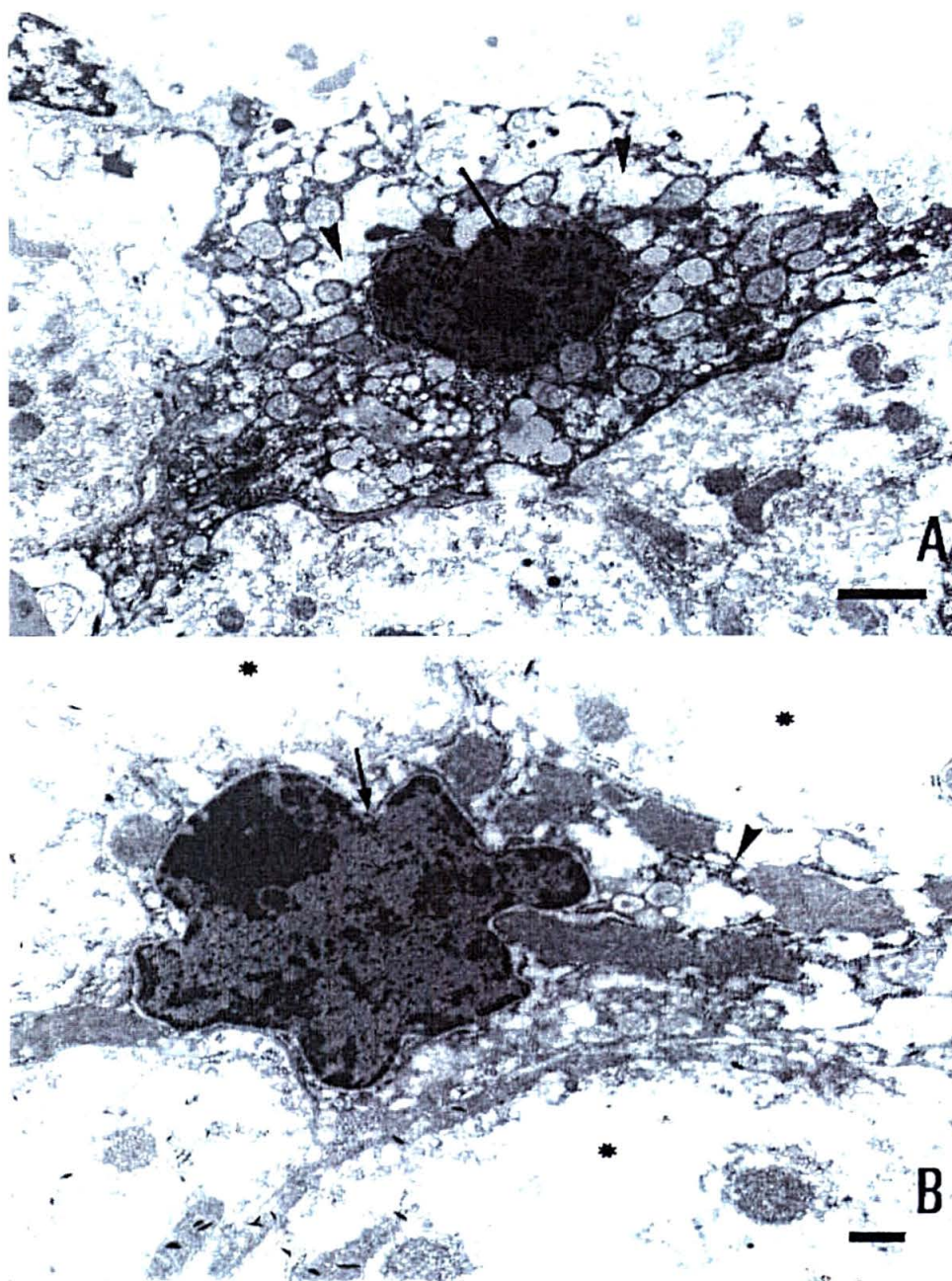


Figura 10- Microscopia eletrônica de Transmissão de fígado de *Astyanax sp.* A e B - Exposição a 33% FSA - 96h. A- Observe a condensação da cromatina dos núcleos (setas) e os largos números de vacúolos autofágicos no citoplasma (ponta de seta). Tarja = 2 μ m. B- Morte celular dentro de uma área de necrose. Note a forma irregular do núcleo e a degeneração da célula ao redor do mesmo (*). Poucas organelas estão presentes no citoplasma. Tarja = 2 μ m.

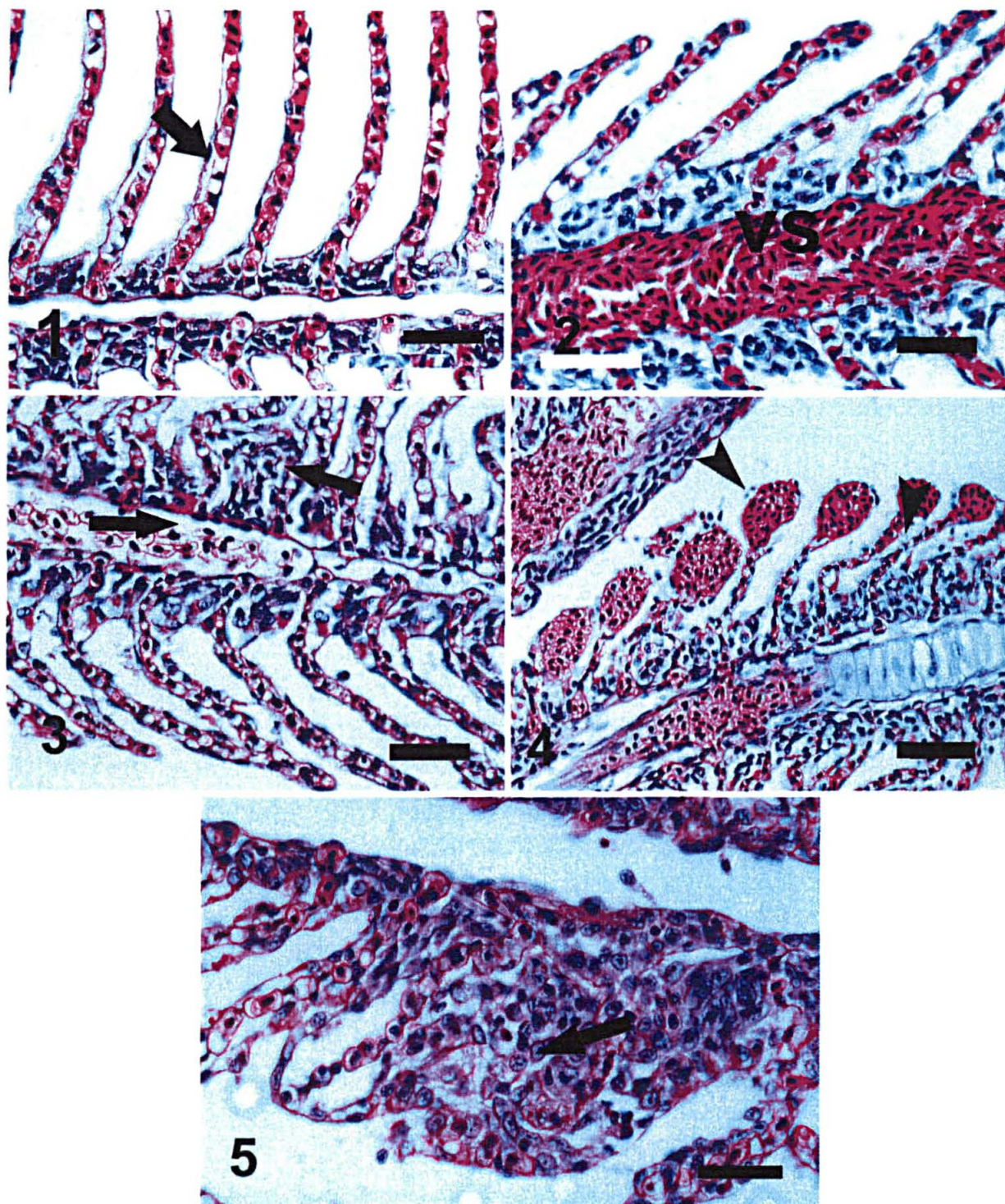


Figura 11- Microscopia de luz de brânquias de *Astyanax sp.* Coloração Hematoxilina e eosina. 1- Controle 24h. Observe a lamela primária e lamelas secundárias com hemácias (seta). Tarja = 15 μ m. 2- Controle 96h. Observe vaso sangüíneo no interior da lamela primária (VS). Tarja = 15 μ m. 3- Exposição a 15%FSA - 12h. Observe a desorganização do epitélio da lamela secundária (setas). Tarja = 15 μ m. 4- Exposição a 15%FSA - 24h. Note aneurismas nas extremidades das lamelas secundárias (ponta de setas). Tarja = 25 μ m. 5- Exposição a 15%FSA - 96h. Observe a proliferação celular na lamela secundária (seta). Tarja = 15 μ m.

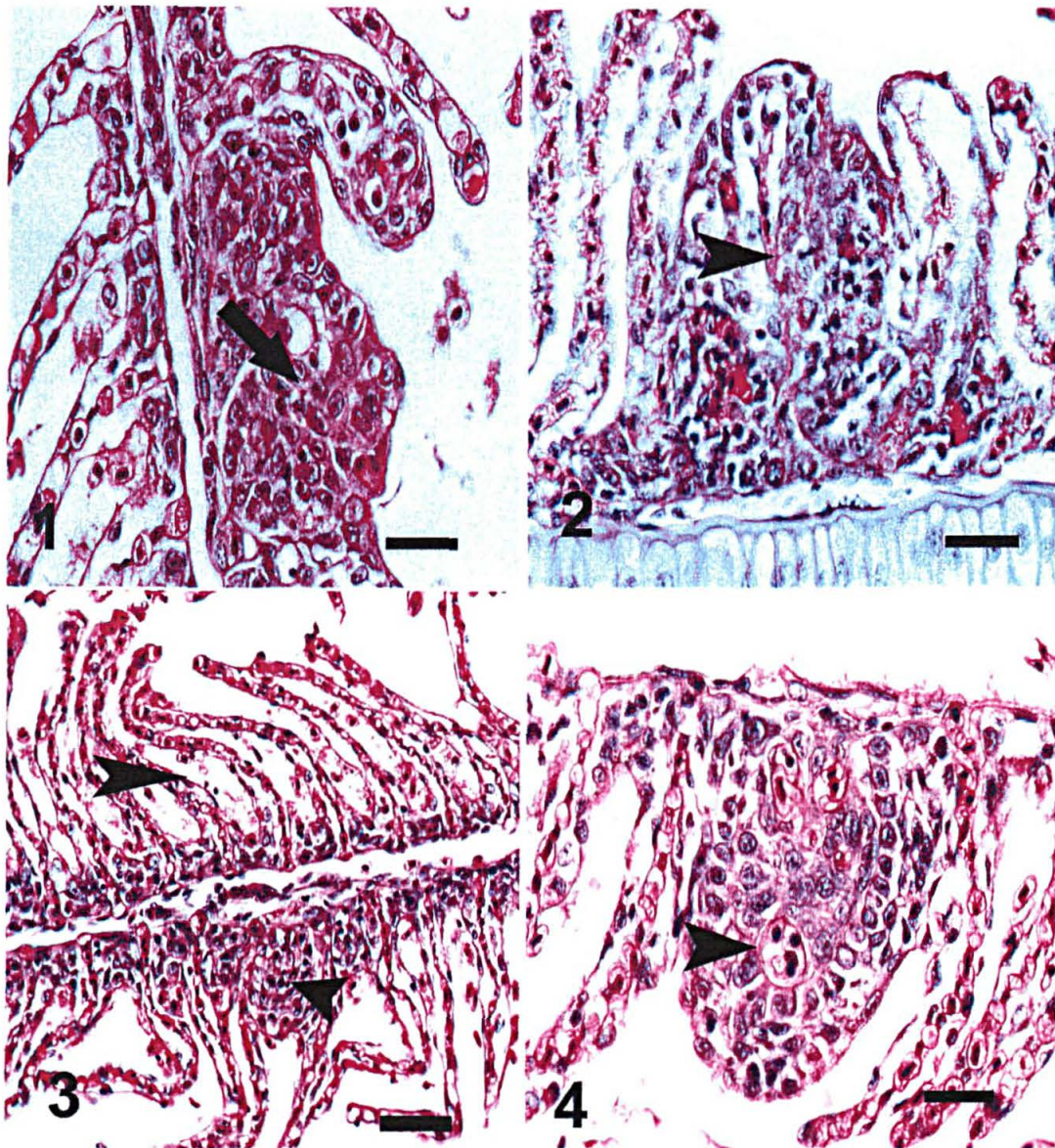


Figura 12- Microscopia de luz de brânquias de *Astyanax sp.* Coloração Hematoxilina e Eosina. Cortes com 5 μ m de espessura. 1- Exposição a 33% FSA – 24h. Note a desorganização das lamelas secundárias acompanhada de proliferação celular (seta). Tarja = 25 μ m. 2- Exposição a 33% FSA – 96h. Observe novamente a proliferação celular na lamela secundária (ponta de seta). Tarja = 15 μ m. 3- Exposição a 50%FSA – 12h. Vista geral da desorganização lamelar e alteração no epitélio branquial (ponta de seta). Tarja = 25 μ m. 4- Exposição a 50% - 96h. Observe em maior aumento a proliferação de células à partir da lamela primária em direção à lamela secundária (ponta de seta). Tarja = 25 μ m.

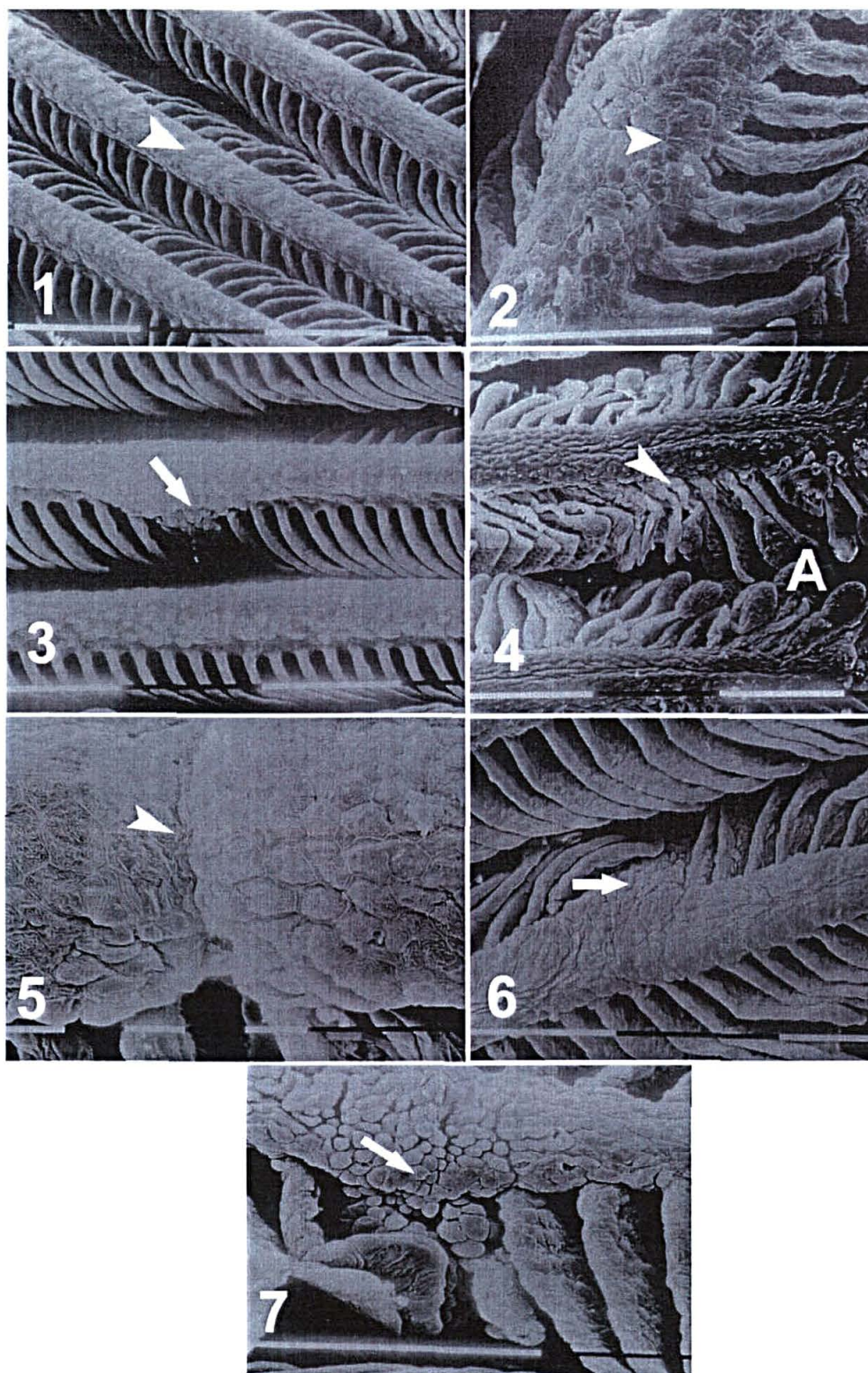


Figura 13- Microscopia eletrônica de Varredura de Brânquias de *Astyanax* sp. 1- Controle 24h. Observe a organização das lamelas primárias e secundárias, sem nenhum tipo de alteração (ponta de seta). Tarja = 0,1mm . 2- Exposição a 15%FSA – 24h. Observe a desorganização e o enrugamento do epitélio (ponta de seta). Tarja = 0,1mm. 3- Exposição a 15%FSA- 12h. Note o desaparecimento de uma lamela secundária e o início da proliferação celular na base da lamela primária (seta). Tarja = 0,1mm 4- Exposição a 15%FSA – 96h. Observe a presença de aneurismas nas extremidades das lamelas secundárias (ponta de seta). Tarja = 0,1mm . 5- Exposição a 33%FSA – 24h. Observe uma alteração no epitélio da lamela primária, aparenta uma diminuição de células (seta). Tarja = 10 μ m . 6- Exposição a 33% - 96h. Note novamente a proliferação celular (ponta de seta). Tarja = 0,1mm . 7- Exposição a 50%FSA. Observe o crescimento e proliferação das células na lamela secundária (seta). Tarja = 0,1mm.

I. 4.6– Neurotoxicidade

O estudo de neurotoxicidade demonstrou que a FSA do petróleo afetou a atividade da acetilcolinesterase nos indivíduos expostos a 15% e 33% da FSA, mas apenas o grupo exposto a 33% apresentou uma inibição da atividade colinesterásica estatisticamente significativa se comparado com os controles (Figura 15). Os indivíduos expostos a 15% da FSA durante 96 horas apresentaram uma diminuição na atividade colinesterásica significativa se comparado com a atividade dos indivíduos expostos a 12 e 24 horas na mesma concentração (Figura 14). Enquanto que os grupos expostos a 33% da FSA durante 24 e 96 horas de exposição tiveram suas atividades enzimáticas reduzidas se comparadas com as atividades dos grupos de indivíduos controle (Figura 15). Surpreendentemente, a mais alta concentração testada (50% da FSA do petróleo) não causou diferenças significativas na atividade da acetilcolinesterase para os indivíduos expostos nos três diferentes tempos (12, 24 e 96 horas) se comparado com os indivíduos do grupo controle (Figura 16).

Estes resultados demonstram que os hidrocarbonetos da fração solúvel do petróleo afeta a atividade da acetilcolinesterase durante exposição aguda e consequentemente eles podem estar alterando as respostas motoras dos indivíduos, levando a diversas alterações no comportamento da espécie, como por exemplo dificuldade de locomoção, alimentação e reprodução.

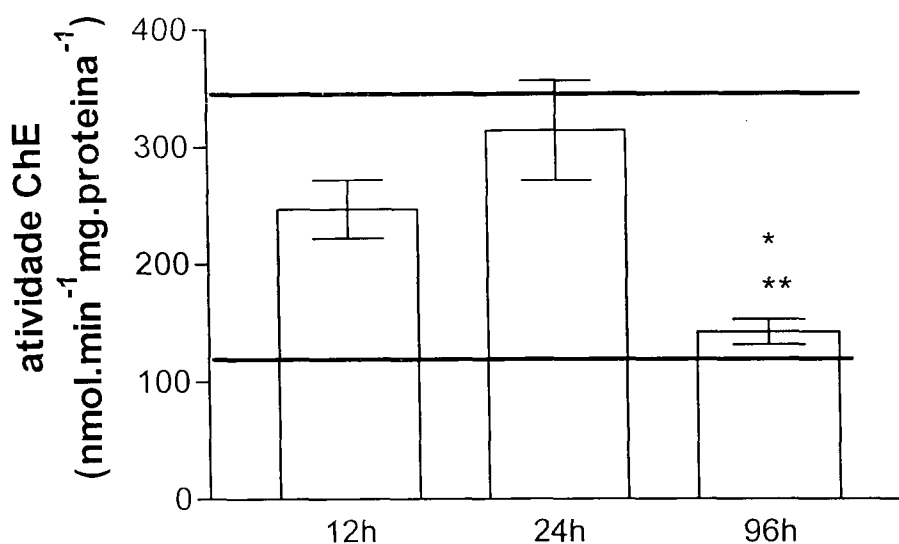


Figura 14- Atividade da acetilcolinesterase em indivíduos provenientes dos grupos expostos a 15% da FSA durante 12, 24 e 96h. * p < 0,05 ** p < 0,01. As linhas significam os valores máximos e mínimos da atividade da enzima nos grupos controle (distribuição normal) n= 10.

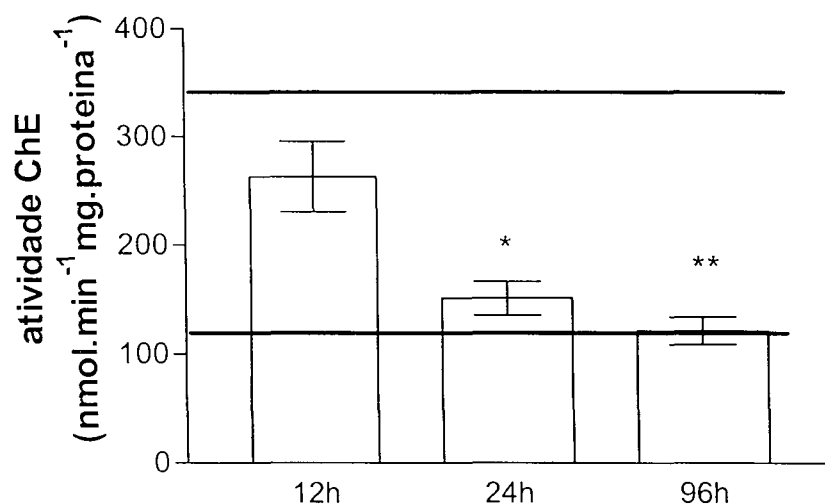


Figura 15- Atividade da acetilcolinesterase nos grupos expostos a 33% da FSA durante 12, 24 e 96h. * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$. As linhas significam os valores máximos e mínimos da atividade da enzima dos grupos controles (distribuição normal) $n=10$.

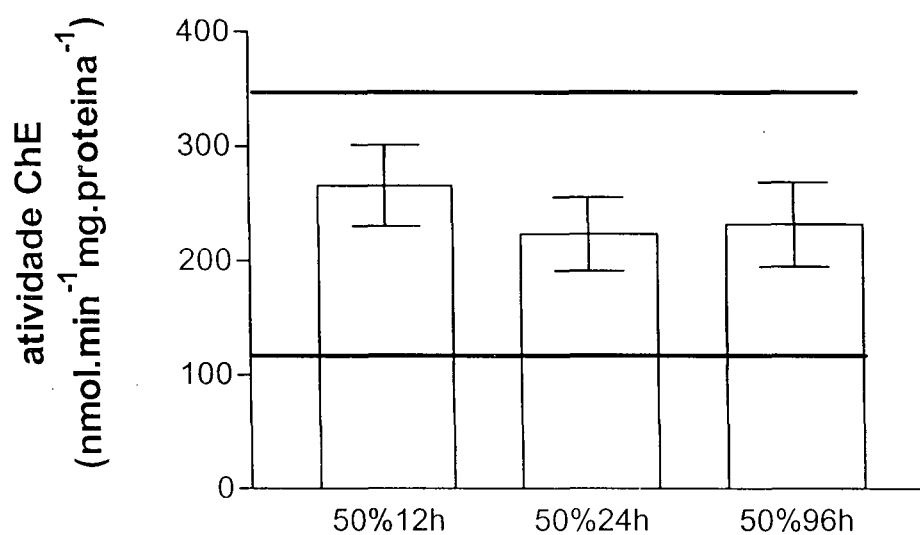


Figura 16- Atividade da acetilcolinesterase nos grupos expostos a 50% da FSA durante 12, 24 e 96h. * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$. As linhas significam os valores máximos e mínimos da atividade da enzima dos grupos controles (distribuição normal) $n=10$.

I. 5- DISCUSSÃO

Uma relação difícil de ser estabelecida nos estudos toxicológicos é a causa/efeito entre os xenobiontes e lesões em peixes (ICES, 1986), isto porque muitas variáveis (ambientais e evolutivas) estão envolvidas. A interação entre a pesquisa de laboratório e a aplicação prática, ligando biomarcadores aos altos níveis de organização biológica representam um desafio para os estudos de toxicologia ambiental atuais e futuros (WESTER et.al, 1994; MOORE, 2002). Desta forma, a investigação das injúrias celulares e patologias associadas com aspectos bioquímicos em peixes pode ser considerada uma importante ferramenta, que quando somada aos parâmetros ambientais podem indicar de forma mais qualificada o grau de impacto sobre um determinado ecossistema.

A técnica de ANDERSON et.al. (1974) na obtenção da fração solúvel, realmente é eficiente demonstrando bons resultados. Ela é descrita em muitos trabalhos relacionados com o estudo dos efeitos da fração solúvel na água (COHEN et al., 2001; STEPHENS et al., 1997), pois é simples, eficaz e de fácil realização.

Diferentes métodos são utilizados para quantificar a concentração de hidrocarbonetos na água, sedimento e biota (cromatografia gasosa, espectrometria de massa, cromatografia líquida, espectrometria de absorção atômica), mas alguns estudos têm usado a espectrofluorimetria para quantificar a concentração de hidrocarbonetos do petróleo em áreas marinhas e dulcícolas contaminadas (PICER, 1998; HAMACHER, 1996). De acordo com HAMACHER (1996), a espectrofluorimetria é altamente sensível para a detecção de hidrocarbonetos, mas esta técnica não permite caracterizar a composição das amostras. Como nesse projeto o interesse foi quantificar a concentração total de hidrocarbonetos nas diluições testadas, o resultado foi satisfatório. O interesse nas análises químicas neste trabalho foi conhecer a real concentração de hidrocarbonetos a que os organismos foram expostos durante o período experimental, e além disso, obter informações sobre o comportamento das moléculas orgânicas no sistema, determinando a biodisponibilidade durante o tempo de exposição. Uma análise qualitativa seria muito interessante no sentido de conhecer a exata composição específica da fração solúvel do petróleo da Bacia de Campos, mas por motivos logísticos não foi possível realizar essa análise.

Todos os tipos de petróleo e/ou óleos apresentam uma composição de hidrocarbonetos da fração solúvel diferente, mas alguns desses hidrocarbonetos são

comuns em quase todas as frações, além de serem altamente tóxicos. Alguns trabalhos apresentam estudos da composição da fração solúvel de diferentes tipos de óleo cru, e o naftaleno é principal hidrocarboneto encontrado em todas as frações e em alta concentração, seguido pelo fluoreno e fenantreno (SAEED e AL- MUTAIRI, 1999; SINGER et al., 2000; ANDERSON et al., 1974). Não foi investigada a exata composição da fração solúvel do petróleo provindo da Bacia de Campos, mas provavelmente, esses hidrocarbonetos comuns na maioria dos óleos também fazem parte da composição da fração solúvel do petróleo estudado neste trabalho e mesmo que em diferentes concentrações, estes poderiam ser os prováveis responsáveis pelos efeitos tóxicos observados a nível morfológico e bioquímico.

A diminuição de hidrocarbonetos dissolvidos na água observada neste trabalho, também foi descrita por STEPHENS et al. (1997), como uma volatilização rápida nas primeiras horas depois da diluição.

Acredita-se que o índice de mortalidade observado no experimento com duração de 96 horas, deve-se ao efeito cumulativo da exposição e às próprias condições dos indivíduos, apesar de haver uma diminuição da concentração de hidrocarbonetos na água após as 96 horas. Considerando que nas primeiras horas havia uma alta concentração, capaz de lesar órgãos vitais dos indivíduos, era de se esperar que houvesse um determinado índice de mortalidade, o que não ocorreu. Isto reflete uma adaptação do organismo frente ao contaminante nas primeiras horas, mas que não é mantida com o passar do tempo de exposição, demonstrado pelo índice de mortalidade e pelos efeitos registrados durante o experimento. Como os indivíduos foram alimentados antes do período experimental, acreditamos que o suprimento alimentar durante o experimento não tenha amplificado o efeito, uma vez que os grupos controles não apresentaram variações significativas entre eles, exceto pela maior irrigação das brânquias após as 96 horas.

As diluições da FSA do petróleo testadas demonstraram causar uma variedade de diferentes lesões em tecidos e órgãos vitais dos teleósteos dulcícolas após exposição aguda, e esses danos podem comprometer a qualidade de vida dos organismos e consequentemente a qualidade do ambiente aquático. O uso da histopatologia como biomarcador para avaliar a toxicidade de contaminantes, contribui para a identificação de danos primários, e isto pode contribuir para evitar que o contaminante afete a reprodução e/ou crescimento da espécie (SEGNER e BRAUNBECK, 1988). Além disso, o estudo histopatológico pode colaborar na tentativa de evitar danos irreversíveis como a morte de indivíduos ou a extinção da

espécie, sendo um dos biomarcadores mais sensíveis. De acordo com HINTON et. al. (1992), a histopatologia é um dos mais rápidos e eficientes métodos para detectar o nível dos efeitos tóxicos (agudo ou crônico) em órgãos e tecidos.

De acordo com HINTON e LAUREN (1990), existem muitas razões para selecionar o fígado como um importante órgão em estudos de toxicologia. O fígado dos teleósteos é o órgão com maior atividade de monoxigenases de função mista e citocromo P-450 1A1, importantes para a inativação de hidrocarbonetos do petróleo, estoca nutrientes, realiza o catabolismo de produtos oriundos de outros tecidos e produz a bile com duplo papel: favorecer a digestão de ácidos graxos e carregar metabólitos tóxicos para a excreção e finalmente, a vitelogenina (importante molécula para o processo de ovogênese) que é também sintetizada pelos hepatócitos.

Diversas alterações no fígado de espécies nórdicas, *Hypsurus Caryi* e *Rachochilus toxodes*, expostas a hidrocarbonetos do petróleo em uma fonte natural, são descritas por SPIES et al (1996). Dentre elas foram evidenciadas atrofia de células pancreáticas, neoplasias, defeitos no estoque lipídico dos hepatócitos, parasitismo e necrose. O tecido hepático dos indivíduos analisados neste presente trabalho apresentaram algumas lesões similares às observadas por SPIES et.al (1996), como regiões necrosadas e presença de parasitas. Necrose representa um significativo dano quando o assunto é lesão hepática. Neste trabalho, a necrose observada no fígado é uma típica lesão aguda, também observada em outros peixes dulcícolas, expostos a diferentes contaminantes (OLIVEIRA RIBEIRO et al.,2000; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002). Esta morte celular induz a uma resposta inflamatória e leva a uma diminuição do número de células saudáveis e funcionais, causando danos ao tecido, influenciando o mal funcionamento dos hepatócitos com o sucessivo comprometimento do órgão.

A observação e o estudo de células não características do tecido hepático, supostamente parasitas, não podem ser usadas como um indicador de toxicidade, pois trata-se de um bioensaio e neste caso, os organismos não estiveram em contato com parasitas durante o experimento, por isso, não é possível afirmar que a presença desses organismos seja um indício de diminuição da resistência imunológica dos indivíduos infectados e também não é possível relacionar a ação dos xenobiontes nessa relação entre espécies. Certamente os organismos já apresentavam estes parasitas quando foram capturados, pois esta é uma relação comum no ambiente aquático. Existem alguns trabalhos que relacionam

comunidades de parasitas de peixes com a qualidade da água aonde estes encontram-se, utilizando essas comunidades como indicadores de estresse ambiental (GALLI et al., 2001; MARCOGLIESE, et al., 1997). Quando trata-se de estudos de biomonitoramento, a presença e incidência de parasitas nos organismos estudados podem ser consideradas um importante indicador de toxicidade, uma vez que os indivíduos expostos aos contaminantes também estão expostos aos parasitas, e o aumento da incidência destes indicam uma diminuição da resistência imunológica ou a diminuição desses podem demonstrar um desequilíbrio no ecossistema e nas relações hospedeiros - parasitas.

Hepatócitos com citoplasma denso e homogêneo e o desaparecimento do limite celular entre essas células hepáticas evidenciam uma modificação na distribuição e funcionamento de organelas e estruturas moleculares que compõem o citoplasma dessas células. Acredita-se que a homogeneidade do citoplasma e a perda do limite entre as células, deve-se a uma diminuição dos lipídios usados em processos metabólicos e ao aumento da produção de proteínas para metabolização de xenobióticos presentes. Estas alterações podem afetar o funcionamento dos hepatócitos, que são células envolvidas em processos importantes, como o metabolismo e armazenamento de nutrientes para obtenção de energia e detoxificação de xenobiontes (CORMACK, 1996). Uma aparente proliferação do retículo endoplasmático e hipertrofia de células do fígado foi descrita por SCHOOR et al 1979 em hepatócitos submetidos à presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, também observado nos indivíduos da espécie *Astyanax sp.* expostos a FSA do petróleo. Os melanomacrófagos identificados nos indivíduos expostos a 15% (12 e 96 horas) podem ser usados como biomarcadores para hidrocarbonetos, como descrito por BROWN et al. (1985). Melanomacrófagos em peixes são geralmente caracterizados pelo acúmulo de vesículas altamente pigmentadas próximas umas das outras e células fagocíticas (MESENGUER et al., 1994). O mesmo autor concorda com a visão de que os melanomacrófagos estejam envolvidos na degradação de catabólitos, células e material exógeno, os quais são processados para neutralização. Isto corrobora na interpretação dos resultados do presente trabalho, onde a FSA do petróleo demonstrou alto efeito tóxico em *Astyanax sp.* durante as primeiras horas de exposição, mesmo na menor concentração.

As brânquias são órgãos essenciais na sobrevivência dos organismos aquáticos, e estas são as primeiras a serem atingidas por contaminantes diluídos na água. Sendo assim, as brânquias constituem importantes órgãos alvos no estudo

dos efeitos tóxicos primários da fração solúvel do petróleo na água. As alterações no epitélio das brânquias observados neste trabalho foi também descrito por SPIES et al. (1996), onde duas espécies *Rachochilus toxodes* e *Hypsurus caryi* foram expostas a uma fonte natural de petróleo. Aneurismas e alterações nas lamelas como desorganização e hiperplasia foram descritas para espécies de peixes expostos a óleos (SPIES et.al., 1996; WOODWARD et.al, 1983; LOPEZ et.al, 1979). Brânquias de *Oncorhynchus mykiss* expostas a 0.043 e 0.350 mL.L⁻¹ FSA do petróleo por 7, 18 e 30 dias apresentaram separação do epitélio na base da lamela e danos nos filamentos da lamela secundária, associadas com hipertrofia celular (RUDOLPH et al., 2001). Estes resultados obtidos em trabalhos anteriores indicam que as brânquias são muito sensíveis a FSA de óleos. Os dados obtidos neste trabalho são consistentes com as observações acima, e os danos descritos para *Astyanax sp.*, uma espécie tropical, também foram encontrados em espécies nórdicas. Apesar da frequência respiratória não ter sido usada neste trabalho para medir o efeito geral da FSA do petróleo, uma diminuição dessa frequência foi observada por BRAUNNER et al. (1999) em uma espécie brasileira (*Hoplosternum littorale*). De acordo com o mesmo autor, o aumento da frequência respiratória durante a exposição à FSA de óleo cru, pode minimizar o efeito dos hidrocarbonetos nas brânquias. Estes resultados suportam as alterações morfológicas descritas para *Astyanax sp.* e confirmadas por ALKINDI et al.(1996), que observou 60% de redução na capacidade de oxigenação sanguínea venosa depois de 3 horas de exposição a 50% FSA de óleo cru em *Pleuronectes flesus*. Além disso, durante 48 horas de exposição à mesma concentração, um progressivo aumento na concentração de cortisol plasmático foi observado, indicando um significativo stress fisiológico. Todas as alterações fisiológicas relatadas para a exposição da FSA por BRAUNNER et al.(1999), parece razoável para estabelecer uma relação entre exposição a hidrocarbonetos e danos no sistema respiratório. As lesões descritas para o epitélio respiratório de *Astyanax sp*, podem suportar os dados acima e que também foram relatados por PRASAD (1991) em associação com a formação de coágulos de muco nas brânquias e superfície do corpo, causando mortalidade da espécie dulcícola *Puntius sophore*, pela inibição da transferência do oxigênio. De acordo com TAKASHIMA e HIBIYA (1995), a excessiva secreção de muco na lamela primária é devida a morte de células mucosas. A desorganização da lamela secundária, proliferação celular e aneurismas constituem danos nas brânquias que certamente afetará o funcionamento normal do órgão (troca gasosa, processo de regulação

iônica e produção de muco), diminuindo a eficiência desses importantes mecanismos para organismos aquáticos como os peixes.

A acetilcolinesterase é uma importante enzima para o perfeito funcionamento do sistema nervoso, a qual está envolvida na degradação do neurotransmissor acetilcolina. A atividade da acetilcolinesterase é, geralmente, afetada por organofosforados e carbamatos, e durante anos vem sendo considerada um biomarcador específico. No entanto, esta especificidade têm sido questionada por alguns autores que observaram uma diminuição na atividade da acetilcolinesterase em organismos aquáticos expostos a diferentes contaminantes, como metais pesados, hidrocarbonetos e efluentes de indústria de papel (LABROT, et al., 1996; GUILHERMINO et al., 1998; GALGANI e BOQUENE, 1990; PAYNE et al., 1995).

De acordo com PAYNE et al. (1995), detergentes, óleo e efluente de indústrias de papel podem conter inibidores da acetilcolinesterase. Neste presente estudo foi evidenciado que os hidrocarbonetos da fração solúvel do petróleo diminuiu a atividade da acetilcolinesterase, principalmente nos indivíduos expostos a 33% da FSA, mas este resultado não foi observado na concentração de 50%. Ainda não se tem esclarecido uma possível resposta para esse resultado observado, mas algumas hipóteses estão sendo levantadas. A inibição da acetilcolinesterase está ligada diretamente com os mecanismos de ação dos contaminantes e estes não são totalmente conhecidos para hidrocarbonetos.

Um dos objetivos desse trabalho é observar os efeitos tóxicos subletais da FSA do petróleo em peixes tropicais, por isso torna-se difícil explicar a não relação dose-resposta da acetilcolinesterase observada no grupo de indivíduos expostos à mais alta concentração testada (50% FSA). Estudos futuros serão necessários para investigar alguns dos efeitos observados, como testes "*in vitro*" para se conhecer se o óleo afeta diretamente a acetilcolinesterase ou metabolismos dependentes.

O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase pelos hidrocarbonetos é desconhecido, mas sabe-se que a fração solúvel do petróleo é composta de hidrocarbonetos heterocíclicos e poliaromáticos associados com nitrogênio e grupos sulfidrilas. Uma hipótese levantada é que os hidrocarbonetos associados com nitrogênio pode ligar-se ao sítio aniônico das moléculas de acetilcolinesterase. Mas, esta hipótese tem que ser melhor estudada e testada. De acordo com GALLO e LAWRYK (1991), o primeiro passo para a formação do complexo acetilcolinesterase-acetilcolina parece ser estabelecido por uma ligação eletrostática entre cargas

positivas do nitrogênio quartenário da parte colina da acetilcolina e o sítio aniônico da acetilcolinesterase. Esta ligação parece ser um pré-requisito para a ligação da parte acetato da acetilcolina no sítio esterásico da enzima. Assim, se o sítio aniônico da enzima é ocupado por hidrocarbonetos associados com nitrogênio, a acetilcolina não pode ligar-se propriamente na enzima.

As respostas histológicas juntamente com as bioquímicas, demonstram que os indivíduos expostos são mais fracos e sensíveis dentro de uma população, relacionando isso com o ambiente natural, é bem possível que esses indivíduos sofreriam uma maior pressão seletiva (discriminada ou indiscriminada). De acordo com BIRTWELL et al. (1999), o benzeno foi o primeiro constituinte da FSA do óleo cru de "North Slope". O resultado da exposição de organismos a este composto resultou numa diminuição na recepção quimiosensorial com prováveis consequências no comportamento alimentar, reprodutivo e defesa (BABCOCK, 1985), isso demonstra de forma mais direta a interferência desses hidrocarbonetos na sobrevivência dos organismos aquáticos expostos.

Este trabalho mostra que a exposição da fração solúvel do petróleo em água, obtida de Amostras da Bacia de Campos – RJ, comprovadamente causa comprometedores danos aos indivíduos de *Astyanax sp* expostos a ela nas primeiras 96 horas de exposição. Sendo assim, faz-se necessário conhecer melhor os reais efeitos destes contaminantes durante estas primeiras horas, simulando um derramamento de petróleo ou derivados. É importante no entanto, verificar se estas lesões permanecem mesmo após o período inicial de contato com a FSA, ao mesmo tempo que ampliar os estudos dos efeitos através de mais dados bioquímicos e de presença dos componentes da FSA e tecidos de órgãos alvos.

I. 6 - CONCLUSÕES

-Os dados obtido demonstram que a Fração solúvel do petróleo da Bacia de Campos em água, apresentou um alto potencial tóxico durante as primeiras 96 horas de exposição.

-A histopatologia e a atividade da acetilcolinesterase foram biomarcadores adequados ao estudo realizado, pois ambos demonstraram de forma considerável os efeitos tóxicos causados pela FSA do petróleo na espécie *Astyanax sp*.

-*Astyanax sp* foi um bom bioindicador para este estudo, adaptando-se facilmente às condições laboratoriais.

-A concentração de hidrocarbonetos para cada diluição obedeceu uma ordem decrescente durante os períodos amostrados, comprovando o caráter volátil das moléculas que compõem a FSA.

-As lesões histológicas em fígado e brânquias (necroses, apoptoses, perda de limite celular, presença de melanomacrófagos, proliferação celular e aneurismas) demonstraram o alto potencial tóxico da FSA em *Astyanax sp.*

-Os dados obtidos neste trabalho permitem sua utilização como um parâmetro de grande potencial no gerenciamento ambiental, principalmente em situações de derramamentos de petróleo ou óleos derivados em ecossistemas de água doce.

-As respostas subletais histopatológicas para a exposição à FSA observadas neste trabalho, certamente significam uma perda da qualidade de vida e longevidade dos indivíduos expostos.

-Os componentes da FSA apresentam efeitos sobre a atividade da acetilcolinesterase no sistema nervoso de *Astyanax sp.*

-Este estudo sugere que nas primeiras horas após um derramamento de petróleo e/ou seus derivados, podem ocorrer consideráveis danos aos organismos expostos no ambiente aquático dulcícola, no entanto há a necessidade de investigar se estes danos são reversíveis.

- Futuros estudos utilizando biomarcadores bioquímicos e estudo *in situ* em regiões comprovadamente afetadas pela presença de despejos desta natureza, poderão complementar este trabalho, resultando em um diagnóstico mais completo dos efeitos da FSA do petróleo na espécie *Astyanax sp.*

CAPÍTULO II

O USO DE BIOMARCADORES EM MONITORAMENTO AMBIENTAL: O CASO DO PORTO DE PICTOU – CANADÁ

Department of Fisheries and Oceans – DFO
Gulf Fisheries Centre

Orientação:
Dra. Sylvie St-Jean
Department of Fisheries and Oceans

Co-orientação:
Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Departamento de Biologia Celular/UFPR

Colaboração:
Dr. Simon Couternay
Department of Fisheries and Oceans

Dr. David Cone
St- Mary's University - Halifax

Dr. Emillien Pelletier
Institute de Science de le Mer - Québec

II.1- INTRODUÇÃO

De acordo com o *Chemical Abstract Service* (CAS, 2003), uma divisão da *American Chemical Society*, existem aproximadamente 44,5 milhões de substâncias químicas registradas até esta data. O despejo de efluentes contendo as mais variáveis substâncias químicas nos ambientes naturais vem aumentando gradativamente e pouco se sabe a respeito dos prováveis impactos que estes compostos podem causar principalmente aos ecossistemas aquáticos e aos organismos que ali vivem. Preocupados com este problema, alguns países vêm intensificando estudos que visam o estabelecimento de técnicas para monitoramento do potencial tóxico dos diversos contaminantes, o grau de contaminação ambiental e o diagnóstico das áreas impactadas, com o intuito de prevenir e/ou remediar os efeitos tóxicos (BURGEOT et al., 1996).

Para um estudo de toxicologia ambiental, é necessário a utilização de um conjunto de diferentes biomarcadores associando diferentes níveis de organização biológica, tanto para estudos em laboratório como para monitoramento em campo. Desta forma é possível gerar dados que possibilitem uma relação mais direta do efeito dos contaminantes sobre os organismos atingidos, possibilitando um melhor entendimento da ação dos xenobiontes sobre os ecossistemas estudados.

Neste capítulo será apresentado um estudo desenvolvido através de uma colaboração entre o Laboratório de Toxicologia Celular do Departamento de Biologia Celular – UFPR e o Laboratório de Ecologia Marinha e Toxicologia do Department of Fisheries and Oceans – NB, Canadá. Esta colaboração viabilizou o aprendizado e o treinamento em algumas metodologias utilizadas em biomonitoramento ambiental tais como: biomarcadores bioquímicos, somáticos, e morfológicos. Fez parte ainda do período de treinamento, associar aspectos ecológicos como a relação parasita-hospedeiro com a presença de contaminantes.

II.1.2- Biomarcadores Morfológicos e Bioquímicos

Como já discutido no Capítulo I, os biomarcadores morfológicos são muito importantes nos estudos dos efeitos tóxicos diretos de xenobiontes em órgãos alvos, além disso é um método rápido de detecção de efeitos agudos e crônicos de exposição à contaminantes (HINTON et al., 1992). Uma desvantagem no uso de biomarcadores morfológicos é que estes não apresentam uma grande especificidade, tornando difícil a determinação de que contaminante está sendo

responsável pelas lesões observadas. Mas, quando estes são utilizados juntamente com outros biomarcadores como os bioquímicos, obtém-se uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos de contaminantes em organismos vivos.

O estudo de parâmetros bioquímicos, permite avaliar o grau de toxicidade dos compostos presentes na água, uma vez que estes são normalmente os primeiros a sofrerem a ação do agente tóxico (STEGEMAN et al., 1992), e além disso, são mais sensíveis que outros níveis de organização biológica. As respostas bioquímicas se caracterizam num primeiro momento, pela interação entre o xenobionte e as moléculas presentes no citoplasma das células, alterando a expressão ou a atuação das mesmas. Isto pode facilitar a eliminação do contaminante ou induzir sinais moleculares na célula que podem iniciar mais de uma resposta fisiológica em um determinado organismo. Os biomarcadores bioquímicos podem ser muito informativos do ponto de vista toxicológico, ajudando a identificar os mecanismos causais responsáveis por qualquer efeito biológico (SCHLENK e DI GIULIO, 2002). Neste trabalho foram utilizados como biomarcadores bioquímicos, a atividade da acetilcolinesterase e a concentração da metalotioneína.

II.1.2.1- Acetilcolinesterase

Como já mencionado na secção I.1.6 página 9, a acetilcolinesterase é uma enzima com alta especificidade para organofosforados e carbamatos, mas alguns estudos demonstram que a atividade dessa enzima pode ser alterada por outros compostos como detergentes, óleos e efluentes de indústria de papel (PAYNE et al., 1995; LABROT, et al., 1996; GUILHERMINO et al., 1998; GALGANI e BOQUENE, 1990). Por isso, torna-se um biomarcador muito interessante para estudo de monitoramento em campo para diferentes efluentes. Mais informações sobre essa enzima podem ser encontradas na secção I.1.6 na página 9 do capítulo I.

II.1.2.2- Metalotioneína

As metalotioneínas são proteínas citosólicas relativamente pequenas que ajudam a manter regulada a homeostase dos metais essenciais, assim como o potencial redox das células. Apresentam uma porcentagem significativamente alta de grupos tióis na sua composição, podendo interagir covalentemente com a maioria dos metais em transição (SCHLENK E DI GIULIO, 2002). As metalotioneínas são encontradas em animais e plantas, e apresentam um código genético muito bem preservado. A sua expressão é induzida na presença de alguns metais pesados

como cádmium, cobre, zinco, mercúrio, chumbo e prata (HODSON, 2002). Estas proteínas imobilizam esses metais pesados e desta forma evitam que os mesmos afetem as células. Assim, quando existe uma alta concentração de metais pesados no citoplasma das células, ocorre um aumento da expressão dessa proteína, aumentando conseqüentemente sua concentração citoplasmática. A metodologia empregada neste projeto permite conhecer as concentrações das metalotioneínas nas amostras de brânquias ou qualquer outro tecido.

II.1.3- Estudo da Comunidade de Parasitas

Este aspecto está voltado para o estudo da ação tóxica de contaminantes a um nível superior de organização biológica em um determinado ecossistema, mas também pode contribuir com importantes informações sobre os efeitos tóxicos dos contaminantes na espécie e no ambiente estudado.

Os parasitas são indicadores de vários aspectos biológicos do seus hospedeiros, incluindo dieta, migração, recrutamento e filogenia (WILLIAMS et. al., 1992), mas estes também podem ser bons indicadores da presença de contaminantes no ambiente (RIGGS et. al., 1987; SURES et. al., 1994). Muitos parasitas apresentam um ciclo de vida complexo, e dependem de uma variedade de hospedeiros intermediários (vertebrados e invertebrados). Assim, estudar a composição de parasitas em uma espécie pode render boas informações sobre a ação de xenobiontes sobre os hospedeiros e até mesmo sobre os parasitas. Os contaminantes podem influenciar na distribuição das espécies parasitas, pelo fato de poderem estar afetando os hospedeiros intermediários (Ex.: diminuição do número de hospedeiros) e conseqüentemente impossibilitando a conclusão do seu ciclo de vida. Por um outro lado, os contaminantes podem estar afetando o sistema imune dos hospedeiros e estes podem estar mais susceptíveis à infecção parasitária. Não importa qual esteja sendo a ação desses compostos tóxicos, eles estão sendo responsáveis pelo desequilíbrio na organização biológica do ambiente em estudo.

II.2- OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Biomonitoramento de uma região portuária, visando o treinamento e o aprendizado de metodologias que empreguem diferentes tipos de biomarcadores no diagnóstico de áreas impactadas.

Objetivos Específicos

- Estudar cinco áreas impactadas por diferentes efluentes no Porto de Pictou, Nova Scotia – Canadá e duas controles, avaliando seus efeitos tóxicos na espécie nórdica *Fundulus heteroclitus* através de biomarcadores morfológicos, bioquímicos e somáticos.

- Estudar a comunidade de parasitas infectando *Fundulus heteroclitus* e relacionar quando possível sua distribuição com os efeitos tóxicos de contaminantes na relação hospedeiro–parasitas.

II.3- MATERIAL E MÉTODOS

II.3.1– Colaboração Internacional

A grande parte das metodologias apresentadas foram realizadas no laboratório *Marine Ecology and Toxicology* do *Department of Fisheries and Oceans*, Moncton, New Brunswick, Canadá sob orientação da Dra. Sylvie St-Jean.

II.3.2– Área de Estudo

O local de estudo está localizado ao Norte da Província de Nova Scotia, próximo ao município de Pictou. As cinco áreas impactadas encontram-se próximas ao Porto de Pictou, enquanto que as duas áreas referência estão localizadas no extremo norte e sul desse Porto. O complexo aquático do Porto de Pictou inclui o estuário, alguns rios e baías. Este sistema estuarino deságua no Estreito de Nothumberland.

Uma das áreas definidas como referência situa-se ao norte do Porto de Pictou na praia de Caribou, enquanto a outra área referência localiza-se ao sul, próximo ao município de Merigomishi a aproximadamente 40km de cidade Pictou.

O Estuário de Pictou recebe diferentes efluentes oriundos de atividades antropogênicas desenvolvidas na região. A cidade de Pictou é um grande centro industrial e duas grandes indústrias estão instaladas ao seu redor, Usina de produção de energia e Indústria de manufatura de papel. Todos os rejeitos produzidos nessas indústrias são despejados no estuário de Pictou. Além dessas indústrias, já existiu outras, como indústria de fabricação de pneus, a qual foi desativada, mas seus resíduos ainda persistem nos ecossistemas aquáticos da região. Além desses efluentes, uma grande atividade agrícola é desenvolvida na região, e o esgoto doméstico tratado e não-tratado também tem seus efluentes desembocando no estuário.

Neste projeto foram escolhidas cinco áreas que recebem diferentes tipos de efluentes e duas áreas consideradas como referência (Figura 17). São elas:

Caribou → Área controle

Merigomishi → Área controle

Camping Ground → Efluente de esgoto da cidade de Pictou sem tratamento.

Boat Harbour → Efluente com resíduos da indústria de papel.

Power Plant → Efluente aquecido por usina de produção de energia elétrica.

ERPAS → Efluente de esgoto da cidade de Pictou com tratamento secundário.

West River → Efluente proveniente da atividade agrícola.

Cada efluente apresenta uma variedade de elementos e substâncias em sua composição química que são potencialmente tóxicos. Existem muitos estudos sobre os efeitos tóxicos dos efluentes de indústria de papel, e em vários destes estudos foi demonstrado que ocorre uma indução da atividade da EROD no fígado dos indivíduos que vivem num ambiente que recebe esse efluente (MARTEL et. al., 1996).

Sabe-se que esses efluentes apresentam muitos compostos clorofenóis, ligninas, fenóis e resinas ácidas (JENEY et. al., 1995). Até o momento, sabe-se que o efluente proveniente da usina de energia elétrica afeta a biota apenas devido ao aquecimento da água e não foi encontrado nenhuma substância química tóxica nesse efluente em estudos anteriores, mas o aumento da temperatura da água pode causar vários danos aos animais, principalmente na sua fisiologia.

Os esgotos tratados e não-tratados são uma mistura de compostos orgânicos que aumentam o processo de eutrofização no ambiente aquático, onde observa-se uma diminuição na oxigenação da água e isto, conseqüentemente, afeta a saúde dos organismos. Os pesticidas, principalmente organofosforados e carbamatos inibem a atividade da acetilcolinesterase, como já citado no capítulo I.

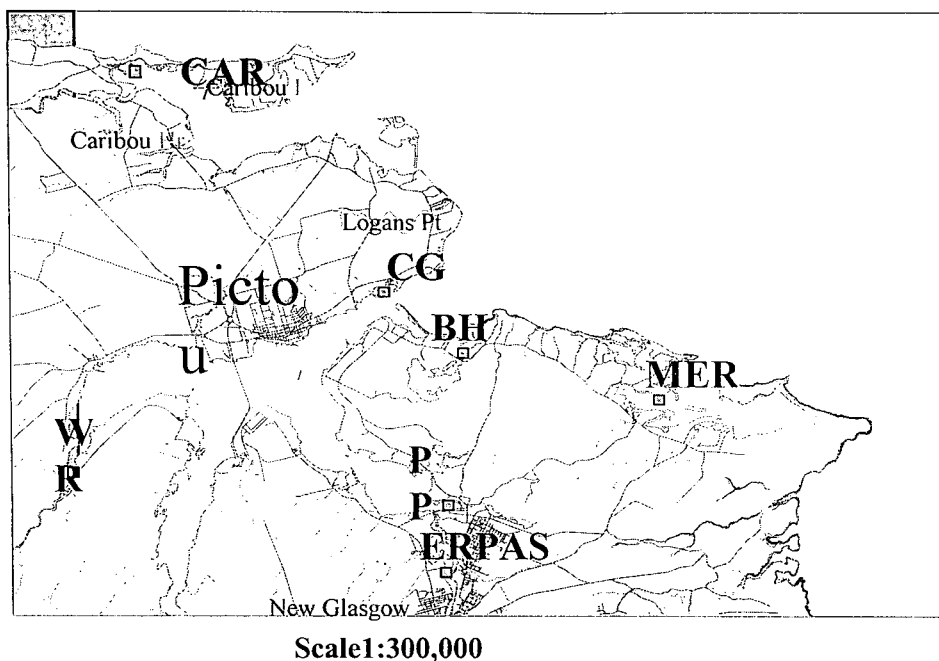


Figura 17- Mapa do Porto de Pictou, Nova Scotia , Canadá. CAR e MER= áreas referência; CG= esgoto não-tratado; ERPA= esgoto com tratamento secundário; BH= Indústria de papel; PP= Usina de energia elétrica; WR= Agricultura.

II.3.3- Espécie Bioindicadora

A espécie escolhida para este estudo foi o teleósteo marinho *Fundulus heteroclitus* (Figura 18), conhecido popularmente como “mummichog”. São animais de pequeno porte (4 a 13 cm), comumente encontrados em regiões estuarinas ao longo da costa atlântica do Canadá até a Flórida (WEIS E WEIS, 1989). Esta espécie faz parte da ordem Cyprinodontidae, família Fundulidae. Espécies dessa família podem ser encontrados em ambiente dulcícola e marinho (NELSON, 1994). Existe dimorfismo sexual evidente nesta espécie. Os machos são menores e mais escuros dorsalmente e com pigmentação amarela no ventre, já as fêmeas são maiores e mais escuras, sem a presença de pigmentação no ventre.

“Mummichogs” são bons bioindicadores por serem animais muito resistentes, encontrados em ambientes saudáveis e contaminados. É uma espécie carnívora, representando níveis tróficos superiores da cadeia alimentar; residente, o que possibilita relacionar as possíveis lesões observadas nos indivíduos com os contaminantes encontrados nos locais onde esses foram amostrados.



FIGURA 18- Espécime fêmea adulto de *Fundulus heteroclitus*.

II.3.4- Coletas de Campo

Todas as coletas ocorreram no verão, durante um único mês (junho/2002). Durante cada coleta foi medida salinidade e temperatura da água.

Os animais foram coletados usando armadilhas conhecidas como covo (Figura 19) ou rede de arrasto (Figura 19), sempre durante a maré alta. Os indivíduos coletados foram mantidos em caixas isotérmicas com água do próprio local amostrado e a aeração nessas caixas foi mantida até a finalização das atividades laboratoriais.

No laboratório de campo, os animais eram anestesiados com MS-222 0.002% e sacrificados através do rompimento da caixa óssea cranial. O comprimento total e peso total eram medidos e o sexo era determinado. Foram realizadas várias coletas e em cada uma delas eram retirados determinados órgãos para cada uma das análises propostas. Os 10 primeiros indivíduos de cada área foram coletados para análise de microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV), atividade da acetilcolinesterase (AChE). Para ML, foram retirados fígado e o segundo arco branquial esquerdo, que foram fixados em ALFAC por 16 horas. Para MEV, foi retirado o segundo arco branquial direito fixado em Glutaraldeído 3% em tampão Cacodilato 0.1M pH 7.4. O Cérebro e o músculo foram congelados a -20°C para posteriormente medir a atividade da Acetilcolinesterase.

Trinta indivíduos por área foram coletados para o estudo da comunidade de parasitas e foram fixados em formol 10% durante 7 dias. Vinte e cinco animais tiveram suas brânquias amostradas, divididas em 5 pools e congeladas no nitrogênio.

líquido, para medir a concentração de metalotioneína. Todos os animais foram pesados e medidos para posterior determinação do fator de condição e além disso, os fígados foram pesados para determinação do índice hepatossomático.

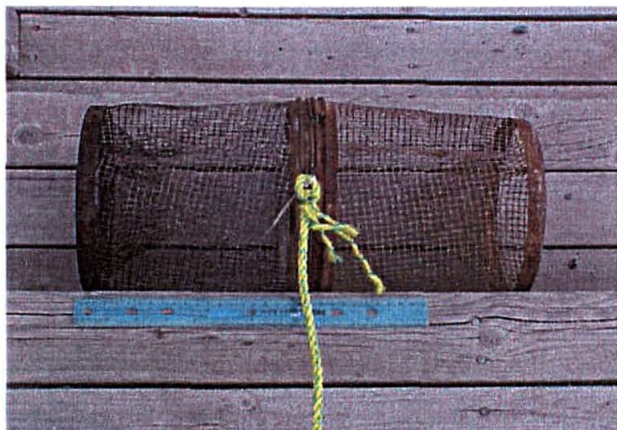


Figura 19 – Armadilha de metal, conhecida como covo e rede de arrasto.

II.3.5– Índice Hepatossomático

Este índice possibilita a visualização da proporção existente entre o fígado e o corpo do animal, sendo calculado através da seguinte fórmula:

$$IHS = PF/PT \times 100$$

PF = peso do fígado em gramas

PT = peso total do animal em gramas.

II.3.6– Fator de Condição

O fator de condição (FC) demonstra o bem-estar do peixe com relação ao ambiente em que ele habita. É um parâmetro interessante para ser medido em populações que estão expostas à diferentes condições ambientais (BRAGA, 1986).

$$FC = PT/CT^b \times 100$$

PT = Peso total do animal em gramas

CT = Comprimento total do animal em centímetros

b = Coeficiente angular da relação peso-comprimento = 3.

II.3.7- Histopatologia

A metodologia para estes biomarcadores já foram descritas anteriormente em detalhes no capítulo I (item I.3. 4. 1 página 19 e I. 3. 4. 4 página 23).

II.3.8- Metalotioneína (MT) (VIARENGO et al., 1997)

PREPARO DAS AMOSTRAS

Pools com 5 Brânquias foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido para o transporte e posteriormente mantidas em freezer -80°C.

Reagentes

* Tampão de Homogeneização: 0.5M de sucrose, 20mM de tampão Tris-HCl pH 8.6, 0.006mM de leupeptina, 0.5mM PMSF (fenilmetilsulfonilflúor) (agente antiproteolítico), 0.01% β-mercaptoetanol (agente redutor) (agente antiproteolítico e redutor podem ser preparados em soluções estoques e adicionados somente momentos antes do uso).

* Etanol absoluto

* Clorofórmio

* RNA

* HCl (37%)

Preparo

O tecido foi homogeneizado em três volumes de tampão de homogeneização.

O homogenato pode ser centrifugado a 100.000 X g por 90 minutos à 2-4 °C para obter a fração citosólica ou a 30.000 X g por 20 minutos a 2-4 °C para obter o sobrenadante. Nesta metodologia foi utilizada o sobrenadante, pois não existe uma grande diferença de concentração de proteína entre essas duas frações.

470µl do sobrenadante foi tratado com 490µl de etanol absoluto a -20 °C e 40µl de clorofórmio.

As amostras foram centrifugadas a 6000 X g por 10 minutos a 0 - 4 °C.

O sobrenadante coletado foi combinado com 1mg de RNA e 40µl de HCl a 37% e subsequente com três volumes de etanol frio.

As amostras foram mantidas em -20°C por 1 hora e centrifugadas a 6000X g por 10 min.

O "pellet" contendo a metalotioneína foi lavado com etanol a 87% e clorofórmio (1%) em tampão de homogeneização, centrifugado por 6000 X g por 10

minutos. O sobrenadante provindo dessa centrifugação foi eliminado e o excesso remanescente foi secado com papel filtro.

ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO (REAÇÃO DE ELLMAN'S)

Reagentes

33 μ l de NaCl a 0.25M

33 μ l de HCl com EDTA a 4mM

930 μ l de NaCl com 0.43mM de DTNB (5,5 - ditiobis - ácido nitrobenzóico) tamponado com tampão fosfato 0.2M, pH 8.0.

Preparo

Os "pellets" foram ressuspensos em 33 μ l de NaCl (0.25M) e subsequentemente com 33 μ l de HCl (1N) com EDTA (4mM).

Um volume de 930 μ l da solução de NaCl (2M) contendo 0.43 de DTNB com tampão fosfato 0.2M pH 8.0 foi adicionado na amostra a temperatura ambiente.

As amostras foram centrifugadas a 3000 X g por 5 minutos.

O sobrenadante foi lido a 412nm.

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO GLUTATIONA

Reagentes

0.5N HCl

2mM de EDTA

0.43 mM de DTNB em NaCl a 2M em tampão fosfato 0.2M pH 8.0.

Glutathione - S - Transferase

Preparo

A glutathione (GSH) foi usada como peptídeo padrão, para a realização da curva padrão do ensaio. Desta forma foi possível estabelecer a concentração da metalotioneína a partir das concentrações de glutathione previamente conhecidas, pois a metalotioneína apresenta um grande número de grupamentos sulfidrilas (SH) na sua composição, mas a glutathione apresenta apenas uma cisteína. Para isso, foi preparada uma solução estoque de glutathione, a qual foi diluída de forma linear, construindo, dessa forma, uma curva de concentração. As concentrações usadas foram: 120 μ M, 105 μ M, 90 μ M, 75 μ M, 60 μ M, 45 μ M, 30 μ M, 15 μ M, 7.4 μ M e 0. O mesmo procedimento realizado, à partir do ensaio espectrofotométrico, com as amostras contendo as metalotioneínas foi utilizado com a glutathione. A única diferença é com relação as concentrações dos reagentes utilizados, mas estas estão especificadas acima. Estas concentrações de glutathione foram lidas em

espectrofotômetro e através desse dado foi possível construir uma curva relacionando concentração de glutatona com as suas respectivas absorbâncias. Sabendo que $1\mu\text{M}$ de GSH (Glutathione) é igual a $1\mu\text{M}$ de grupamentos sulfidrilas (SH) e sabendo que $1\mu\text{M}$ de GSH é igual a $0.055\mu\text{M}$ de metalotioneína, bastou-se relacionar as absorbâncias medidas em cada amostra com as medidas em cada concentração da glutatona considerando as relações conhecidas entre a glutatona e a metalotioneína citada acima.

II.3.9- Atividade da Acetilcolinesterase

Esta técnica foi descrita em detalhe no capítulo I. A única diferença foi a diluição usada para *Fundulus heteroclitus*, pois essa diluição é diferente entre espécies. Neste estudo a diluição para a medida da atividade foi 1:40 (músculo) e 1:60 (cérebro). E a diluição para a concentração protéica foi de 1:40 em ambos. E o tampão fosfato utilizado para o cérebro deve estar em pH 8.0. O tratamento estatístico dos resultados foi realizado com a análise não paramétrica de variância a um critério, para comparação entre as médias dos grupos (áreas controles, efluentes de indústria de papel, água aquecida, agricultura, esgoto não-tratado e tratado) seguida de Dunnett's, para comparações entre os grupos de áreas impactadas e os controles, ambos os testes com um nível crítico de significância de 5%. Para tal foi usado o programa Systac 10 para as análises.

II.3.10- Medida da Concentração Protéica.

Em todas as metodologias que havia a necessidade de medir a concentração de proteína foi utilizado o método de LOWRY, et al. 1951. Estas medidas foram feitas usando um kit de determinação protéica de diagnósticos da SIGMA®.

II.3.11- Estudo da Comunidade de Parasitas

Os 30 indivíduos de cada área, fixados em formol 10%, foram cortados dorsoventralmente no sentido da cabeça para a nadadeira caudal, sempre na mesma região. Foram obtidos fatias de aproximadamente 3 cm em quatro regiões diferentes em todo corpo dos animais. Metade da cabeça (corte sagital), uma região anterior à nadadeira peitoral, uma região anterior a nadadeira anal e por último, uma região anterior a nadadeira caudal. Essas fatias foram descalcificadas com a solução "Decalcifier II" da Surgipath® (esta solução contém ácido hidrocloreídrico, EDTA e

água), para possibilitar a obtenção de cortes no micrótomo. Todas essas partes foram incluídas e emblocadas em paraplast - SIGMA®, realizando a mesma metodologia apresentada no preparo das amostras para microscopia de luz (capítulo I). Após emblocado, foram obtidos cortes desse material com 5µm de espessura. As lâminas contendo esse material foram coradas com Giemsa, usando uma técnica apropriada à visualização de parasitas.

Coloração com Giemsa

Xilol	10min
Álcool 100%	10 min
Álcool 95%	5 min
Álcool 70%	5 min
Água destilada	5 min
Giemsa (diluí 1ml de corante em 45ml de água destilada)	30 – 45 min
Água	Lavar
Ácido acético (1:1500)	10 sec
Água	Lavar
Álcool 95%	3 min
Álcool 100%	4min
Álcool 100%	5 min
Xilol	5 min
Xilol	5 min

→ Montagem com resina e lamínula

RESULTADO: Núcleo – azul/púrpura

Acidofílicos – pink/rosa

Basofílicos – azul

Eosinofílicos – vermelho/laranja

Grânulos (mastócitos) – púrpura

Parasitos – azul/ azul escuro

II.3.12- Tratamento Estatístico

A atividade da acetilcolinesterase foi tratada estatisticamente, através do teste ANOVA, seguido do pós-teste Dunnet's, usando o software Systac 10.

Os demais dados também foram tratados estatisticamente, através de ANOVA, seguidos do pós- teste Dunnet's. Esses testes foram realizados com o software GraphPad - PRISM 3.0.

II.4- RESULTADOS

Esta segunda etapa do trabalho teve como um dos objetivos o aprendizado de novas metodologias para o estudo de biomarcadores bioquímicos, que poderão ser aplicados em estudos com espécies e em ambiente tropical e subtropical. Este objetivo foi alcançado.

Abaixo serão apresentados os resultados obtidos nesta segunda etapa do estudo.

II.4.1- Parâmetros Abióticos

Durante todo o período de coleta foram medidos a temperatura e a salinidade da água em todas as áreas de coleta.

Como as coletas foram realizadas apenas durante um mês, não houve muita diferença nas medidas de salinidade e temperatura nas áreas amostradas.

A salinidade foi mais baixa nos efluentes da indústria de papel e no proveniente da atividade agrícola (Tabela 03). Estas medidas são importantes, principalmente quando trabalha-se com aspectos voltados para ecologia, como por exemplo o estudo de comunidade de parasitas, pois este fator abiótico pode estar influenciando a distribuição da comunidade no ecossistema, juntamente com a ação tóxica de contaminantes. Além disso, as variações de salinidade no ambiente pode interferir bastante na respostas fisiológicas dos animais. Como esperado, a área que recebe o efluente da atividade agrícola apresentou o mais baixo valor de salinidade por tratar-se da desembocadura de um rio, sofrendo assim menos influência das marés.

A temperatura média variou entre 21 e 32°C entre as áreas amostradas (Tabela 03). A mais alta temperatura observada foi na área que recebe a água aquecida proveniente da usina de energia elétrica. Houve relatos de que a temperatura nesse área já chegou a 40°C (comunicação pessoal, St-Jean, S). A temperatura entre as áreas amostradas não demonstrou diferenças significativas estatisticamente (para $p < 0.05$).

Tabela 3- Parâmetros abióticos medidos nas áreas estudadas:

Efluentes	Salinidade %	Temperatura (°C)
Referência 1	25 ± 0	27,5 ± 0,35
Referência 2	25 ± 0	22 ± 0
Água aquecida	20 ± 0	32,5 ± 0,35
Papel	4,5 ± 0,70	21,5 ± 0,21
Agricultura	2,3 ± 1,15	26,3 ± 0,70
Esgoto tratado	16 ± 0,52	22 ± 0
Esgoto não-tratado	25 ± 0	19,5 ± 0,70

Os valores apresentados correspondem às médias ± o erro padrão.

II.4.2- Índice Hepatosomático e Fator de Condição

As maiores médias de comprimento total e peso total dos machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus* foram observadas nos indivíduos das áreas referências e água aquecida (Figura 20 e 21). O comprimento total dos indivíduos amostrados não apresentaram nenhuma diferença significativa tanto para os machos quanto para as fêmeas entre as áreas estudadas (Figura 20). Enquanto que as fêmeas amostradas nas áreas que recebem esgoto tratado e efluente da atividade agrícola apresentaram um menor peso se comparado com as fêmeas das áreas referências (Figura 21). No caso dos machos, apenas aqueles provenientes do efluente de esgoto não-tratado apresentaram um menor peso se comparado com os machos das áreas referência. Ambas diferenças foram significativas estatisticamente ($p < 0.05$) (Figura 21).

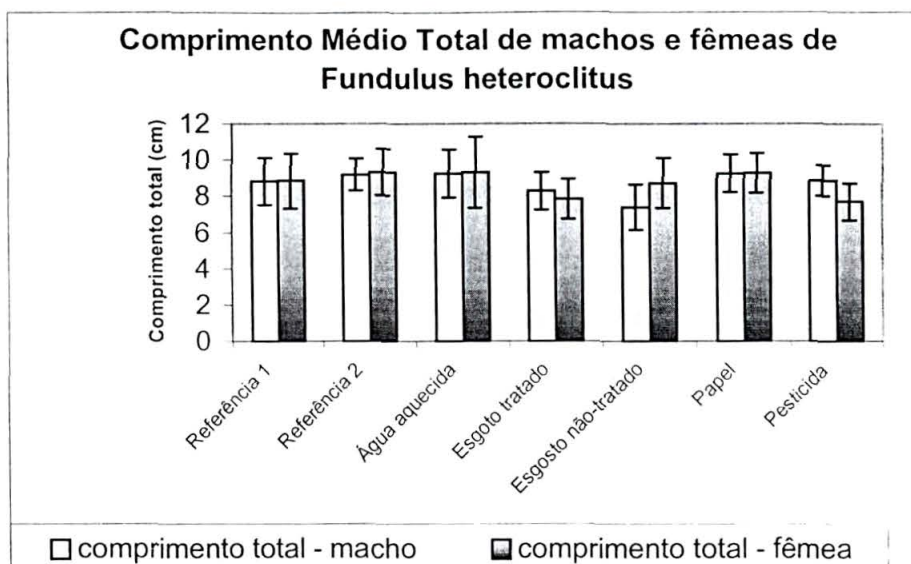


Figura 20- Média do Comprimento total de indivíduos machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referência e efluentes. Medida com nível de significância $p < 0.05 \pm$ erro padrão $n = 35$

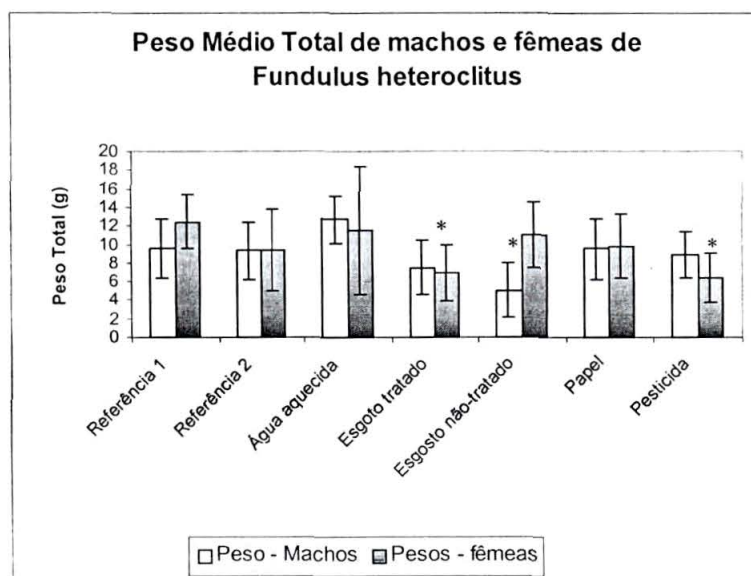


Figura 21- Média do peso total de indivíduos machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus*. Medida com nível de significância $p < 0.05 \pm$ erro padrão $n = 35$.

O índice hepatossomático apresentou diferenças significativas entre as áreas amostradas, tanto para machos quanto para fêmeas. Os machos e as fêmeas da área que recebe esgoto não tratado apresentaram um índice hepatossomático

maior que os das áreas referência (Figura 22), estes animais apresentam um fígado maior que os indivíduos de outros efluentes. As fêmeas dos efluente proveniente do esgoto tratado e água aquecida apresentaram um índice hepatossomático significativamente maior, se comparado às referências (Figura 22).

A análise do bem estar dos indivíduos amostrados, ou seja o fator de condição, não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os animais das áreas referências e efluentes (Figura 23).

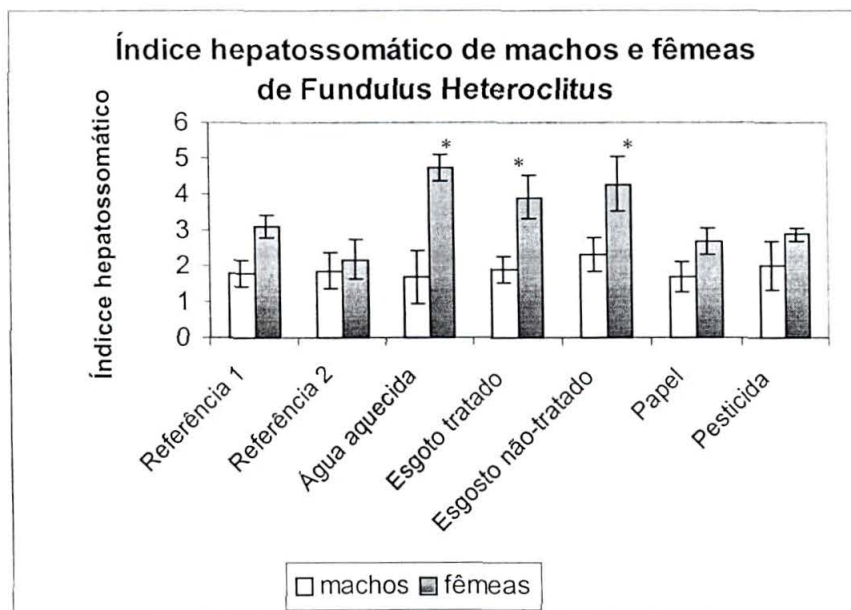


Figura 22- Índice hepatossomático médio de machos e fêmeas da espécie *Fundulus Heteroclitus*, amostrados em áreas referências e efluentes. * diferença com nível de significância $p < 0.05 \pm$ erro padrão $n=35$

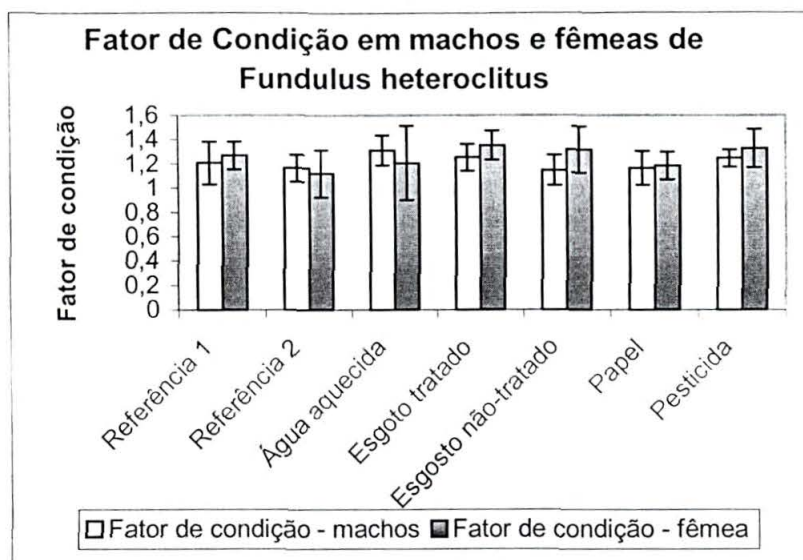


Figura 23- Fator de condição de machos e fêmeas da espécie *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes. Medida com nível de significância $p < 0.05 \pm$ erro padrão $n=35$.

II.4.3- Histopatologia

A análise histopatológica de fígado e brânquias de *Fundulus heteroclitus* demonstrou que os indivíduos estão sendo afetados a nível morfológico pelos efluentes despejados em todas das áreas estudadas.

Fígado e Brânquias – Áreas Referências

A observação macroscópica dos fígados dos indivíduos das áreas referências demonstrou que estes órgãos apresentavam uma boa circulação sangüínea e coloração vermelho escuro característica de fígados normais e saudáveis. Este resultado macroscópico foi confirmado microscopicamente. Através de análises em microscopia de luz foi evidenciado no fígado dos indivíduos das áreas referências uma estruturação tecidual bem definida e semelhante a de órgãos saudáveis, com a presença de uma grande quantidade de sinusóides entre os hepatócitos, o limite entre os hepatócitos é bem definido, o citoplasma das células hepáticas apresentaram-se bem heterogêneo, núcleo arredondado com nucléolo bem visível (Figura 24). Células pancreáticas ao redor de vasos sangüíneos também foram uma das características comuns observadas no fígado dos animais da área controle (Figura 24).

As brânquias também foram observadas macroscopicamente, e estas também apresentaram-se muito mais saudáveis nos indivíduos das áreas referências do que os das áreas impactadas. Muitos parasitas foram observados macro e microscopicamente, mas isto será discutido abaixo. A nível de microscopia de luz, as brânquias dos indivíduos da área referência apresentaram organização e estruturas semelhantes as observadas em órgãos saudáveis. As lamelas primárias partindo do arco branquial, sustentadas por células cartilaginosas. No interior dessas lamelas primárias foi observado um grande vaso sanguíneo repleto de hemácias (Figura 26) e nas laterais as camadas de células epiteliais. Partindo das lamelas primárias foram observadas as lamelas secundárias, e estas também apresentaram-se bem irrigadas por capilares sanguíneos. As brânquias dos indivíduos da área referência 1 (caribou) apresentaram uma pequena hiperplasia das células epiteliais das lamelas primárias (Figura 26). Além disso, também foram observadas larvas de parasitas da família Digenea no interior das lamelas primárias e secundárias, mas estes também ocorreram nas brânquias dos indivíduos das áreas impactadas. A ocorrência desses parasitas será melhor discutida nos resultados do estudo da comunidade de parasitas.

Fígado - Áreas impactadas

A grande maioria dos organismos coletados em todas as áreas impactadas apresentaram algum tipo de lesão hepática. Macroscopicamente era possível observar lesões, como pequenos carcinomas brancos, principalmente no fígado de organismos amostrados no efluente pesticida. Algumas alterações observadas são severas e podem levar a um comprometimento da saúde do animal e outras foram menos drásticas.

Uma das lesões mais comuns encontradas no fígado dos indivíduos amostrados foi a necrose. Os animais provenientes do efluente da indústria de papel, esgoto não-tratado e com tratamento secundário e efluente provindo da atividade agrícola apresentaram grandes lesões necróticas em seus fígados (Figura 24 e 25). Essas lesões necróticas afetaram consideravelmente o órgão. Muitas células morreram, tendo todo o conteúdo citoplasmático extravasado e conseqüentemente uma destruição do tecido hepático. Os animais coletados na área que recebe o esgoto com tratamento secundário apresentaram uma maior quantidade de necroses, além da maior número de lesão, estas também aparentaram serem mais danosas nesses animais (Figura 25).

Outras alterações foram encontradas no fígado como: a perda do limite celular entre os hepatócitos, e a presença de um citoplasma homogêneo e denso, aparentemente sem distinção na distribuição das organelas celulares (Figura 24 e 25). Estas alterações nos hepatócitos foram encontradas em animais coletados em todos os efluentes, mas com uma incidência diferenciada para cada área. A área impactada que apresentou uma maior incidência dessas alterações foi aquela que recebe a água aquecida proveniente da usina de energia elétrica, seguida pelos efluentes do esgoto tratado e não-tratado e indústria de papel. A área que recebe efluente da atividade agrícola foi a que menos apresentou essas alterações celulares.

Brânquias - Áreas impactadas

Assim como o fígado, as brânquias também apresentaram algumas lesões comuns entre os animais amostrados nas áreas impactadas. Macroscopicamente, foi observado que as brânquias dos animais coletados nas áreas de efluente eram menos irrigadas, com uma aparência e coloração pálida. As lesões observadas nas brânquias podem comprometer consideravelmente a troca gasosa com o ambiente para esses organismos.

A lesão mais comum e que também foi observada em alguns indivíduos das áreas referências foi a proliferação celular entre as lamelas secundárias (hiperplasia), mas esta foi muito mais proeminente nas brânquias dos indivíduos das áreas impactadas do que nas dos indivíduos amostrados nas áreas de referência. Na Figura 26, é possível observar que os indivíduos amostrados na área que recebe o efluente da indústria de papel apresentaram uma alta hiperplasia celular na região interlamelar. Esta proliferação celular certamente vai alterar as trocas gasosas com o meio pelas lamelas secundárias, podendo levar o animal à morte. Os animais coletados no efluente da indústria de papel apresentaram uma hiperplasia mais evidente (Figura 26) se comparado com os animais das outras áreas. Além dessa alteração, também foi muito comum a ocorrência de modificações no epitélio branquial, o qual apresentou-se completamente desorganizado, ocorrendo, muitas vezes, até a fusão e/ou desaparecimento das lamelas secundárias (Figuras 26 e 27). Os animais amostrados nas áreas que recebem efluente da indústria de papel e esgoto sem tratamento e tratado apresentaram uma maior desorganização lamelar. Uma terceira lesão, foi a ocorrência de aneurismas, que são dilatações de capilares sanguíneos nas extremidades das lamelas secundárias.

Esta lesão teve uma maior incidência nos indivíduos coletados nos efluentes de água aquecida, indústria de papel e esgoto não-tratado. Assim como todas as outras lesões, esta também pode estar da mesma forma dificultando as trocas gasosas com o meio.

Larvas de parasitas Digenea também ocorreram em alta frequência nas brânquias de indivíduos amostrados em todas as áreas (Figura 27), até mesmo nas áreas referências. Estes também podem estar contribuindo para o comprometimento das funções branquiais, mas a relação hospedeiro-parasita existe no ambiente há muitos milhões de anos, e talvez estes parasitas não sejam responsáveis pelas alterações observadas, mas podem somar-se a estas e assim tornarem-se um fator a mais, a ser considerado. Uma melhor descrição da ocorrência de parasitas em diferentes órgãos está presente neste trabalho mais à frente.

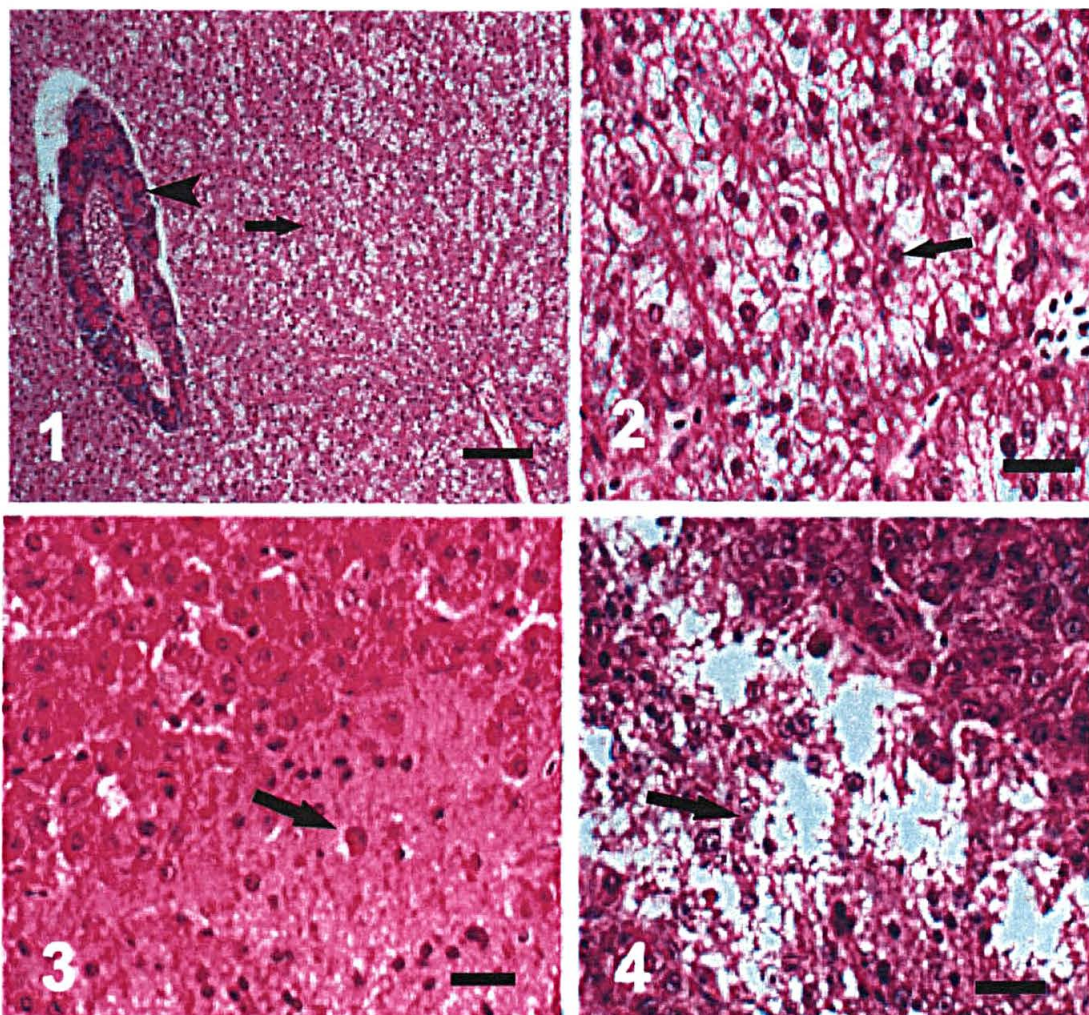


Figura 24 - Microscopia de luz de fígado de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Cortes com 5 μ m de espessura. 1- Área referencia. Observe os hepatócitos com limite celular bem definido (seta) e as células pancreáticas ao redor de um vaso sangüíneo (Ponta de seta). Tarja = 62,5 μ m. 2- Área referencia. Observe os hepatócitos com núcleos bem arredondados e limite celular bem definido (setas). Tarja = 15 μ m. 3 e 4 - Efluente da indústria de papel. Observe a necrose hepática bem evidente com extravasamento de conteúdo citoplasmático (Setas). Tarja = 15 μ m.

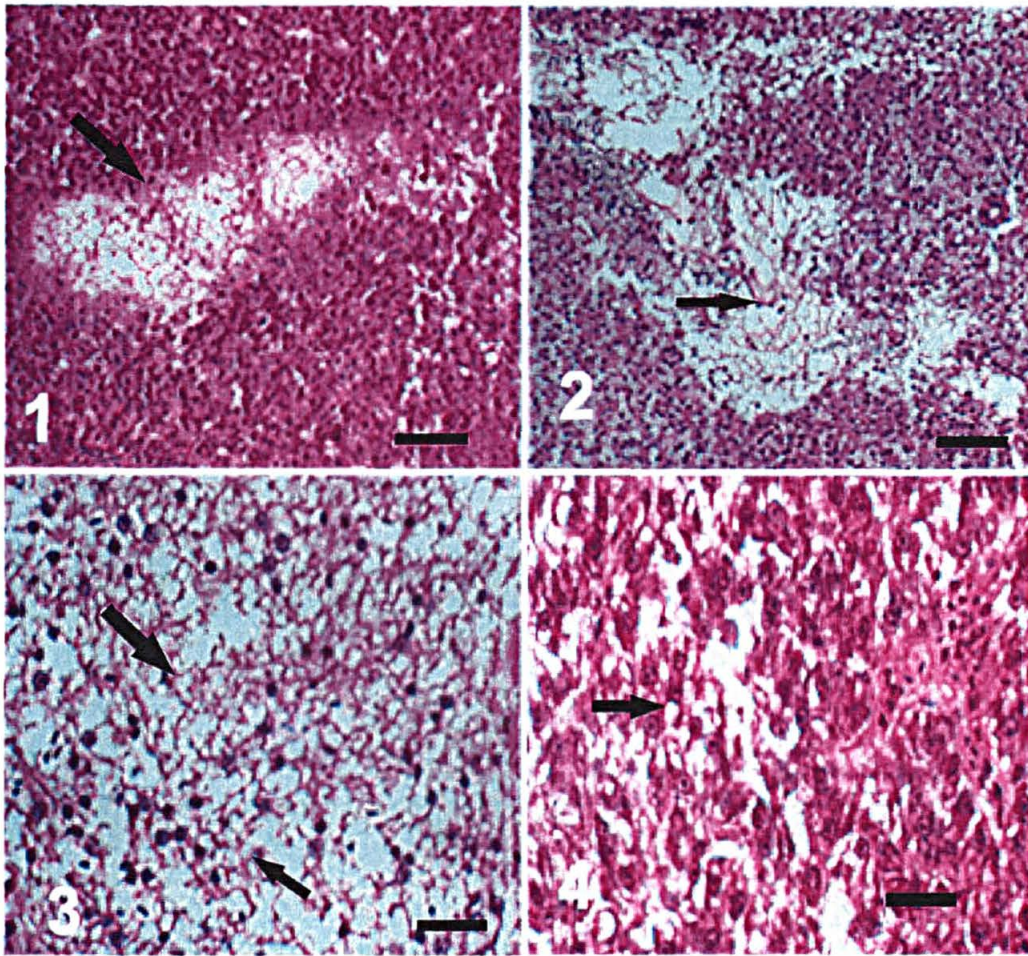


Figura 25 - Microscopia de luz de fígado de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Cortes com 5 μ m de espessura. 1- Efluente Esgoto não-tratado. Observe a grande região necrosada (seta). Tarja = 40 μ m. 2- Esgoto tratado. Novamente, a ocorrência de necrose. Tarja = 40 μ m. 3- Esgoto tratado. Observe necrose e perda de limite celular (seta). Tarja = 15 μ m. 4- Água aquecida. Note que os hepatócitos não apresentam limite celular (seta). Tarja = 15 μ m.

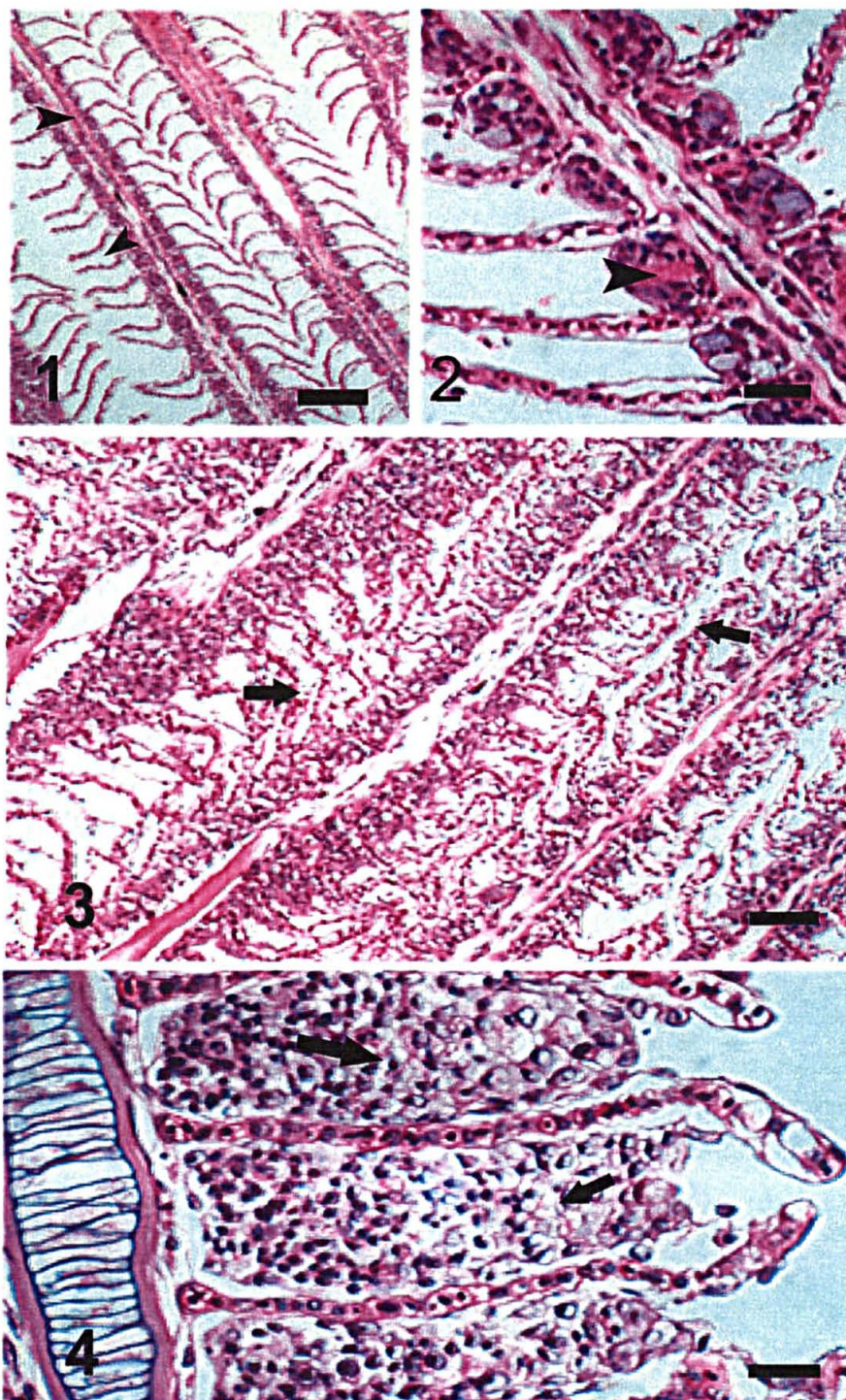


Figura 26 - Microscopia de luz de brânquias de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Cortes com $5\mu\text{m}$ de espessura. 1- Área referencia. Observe as lamelas primárias com vasos sangüíneos no seu interior (ponta de seta) e as lamelas secundárias características (ponta de seta). Tarja = $62,5\mu\text{m}$. 2- Área referencia. Observe em maior aumento uma pequena hiperplasia nas células entre as lamelas secundárias (ponta de seta). Tarja = $15\mu\text{m}$. 3- Efluente da indústria de papel. Note a desorganização do epitélio branquial e das lamelas secundárias (seta). Tarja = $62,5\mu\text{m}$. 4- Indústria de papel. Observe a proliferação celular entre as lamelas secundárias (seta). Tarja = $15\mu\text{m}$.

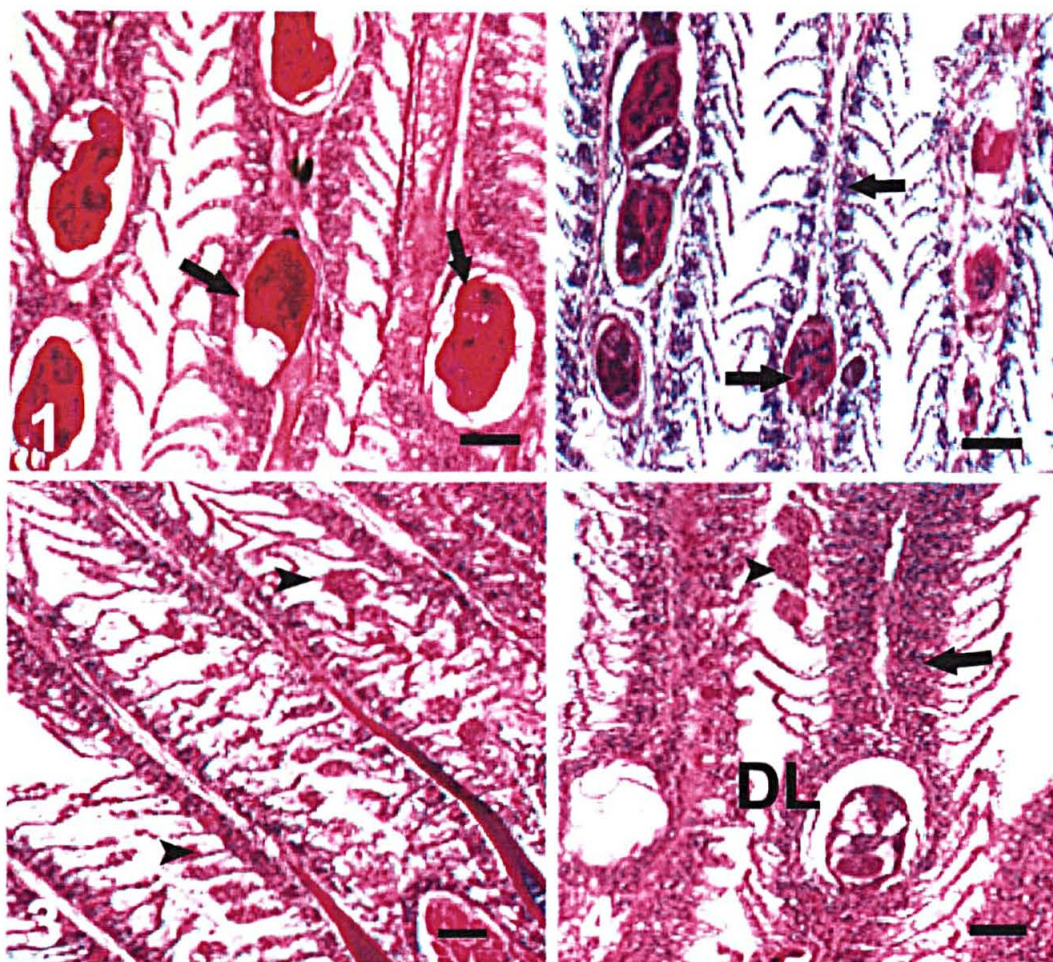


Figura 27 - Microscopia de luz de brânquias de *Fundulus heteroclitus*. Coloração Hematoxilina e eosina. Cortes com 5 μ m de espessura. Efluente da atividade agrícola. Observe a presença de parasitas da ordem Digenea, na forma larval (setas). Tarja = 40 μ m. 2- Esgoto tratado. Novamente a ocorrência de parasitas (seta). Tarja = 40 μ m. 3 -Esgoto não-tratado. Observe a desorganização das lamelas secundárias e a ocorrência de aneurismas (ponta de seta). Tarja = 62,5 μ m. 4 - Água Aquecida. Note a proliferação de células entre as lamelas secundárias (seta), aneurismas nas extremidades das lamelas secundárias (ponta de seta) e a forma larval parasitária da ordem Digenea (DL). Tarja = 40 μ m.

I.4.4.- Atividade da Acetilcolinesterase

A medida da atividade da acetilcolinesterase tanto em músculo assim como em cérebro apresentou um resultado diferente do esperado.

Atividade da Acetilcolinesterase no Cérebro

A atividade da acetilcolinesterase em cérebro nos animais amostrados nas áreas que recebem água aquecida e esgoto sem tratamento não apresentou nenhum aumento ou diminuição na sua atividade, se comparado com os organismos das áreas referências. Enquanto que a acetilcolinesterase cerebral dos animais coletados nas áreas que recebem efluente da atividade agrícola, esgoto tratado e indústria de papel apresentou uma aumento da atividade enzimática significativa estatisticamente (Figura 28). Este resultado foi diferente do esperado, principalmente com relação aos animais da área que recebe o efluente proveniente da atividade agrícola.

Atividade da Acetilcolinesterase no Músculo

O estudo da atividade da acetilcolinesterase no músculo da espécie *Fundulus heteroclitus* também mostrou resultados diferentes do esperado. O animais dos efluentes de água aquecida, esgoto tratado e indústria de papel não apresentaram diferenças significativas estatisticamente com relação aos animais das áreas de referência. Mas, novamente os animais do efluente da atividade agrícola, e desta vez, os animais do efluente esgoto não-tratado apresentaram uma maior atividade enzimática significativa estatisticamente se comparada com a atividade dos organismos das áreas referência (Figura 29).

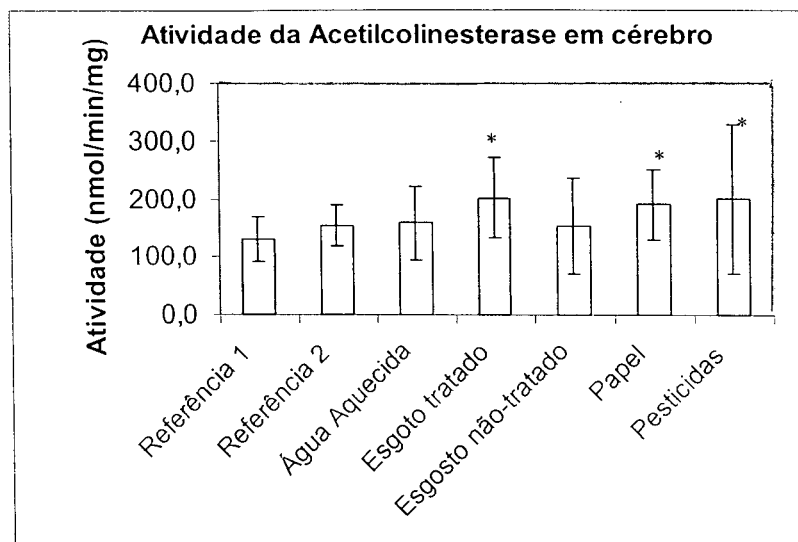


Figura 28- Atividade da Acetilcolinesterase em cérebro da espécie *Fundulus heteroclitus* coletada em duas áreas referência (CAR e MER) e áreas que recebem os seguintes efluentes: água aquecida (PP), Esgoto tratado (ERPAS) e não-tratado (CG), indústria de papel (BH) e atividade agrícola (WR). * atividade com nível de significância de 5% \pm erro padrão n=10.

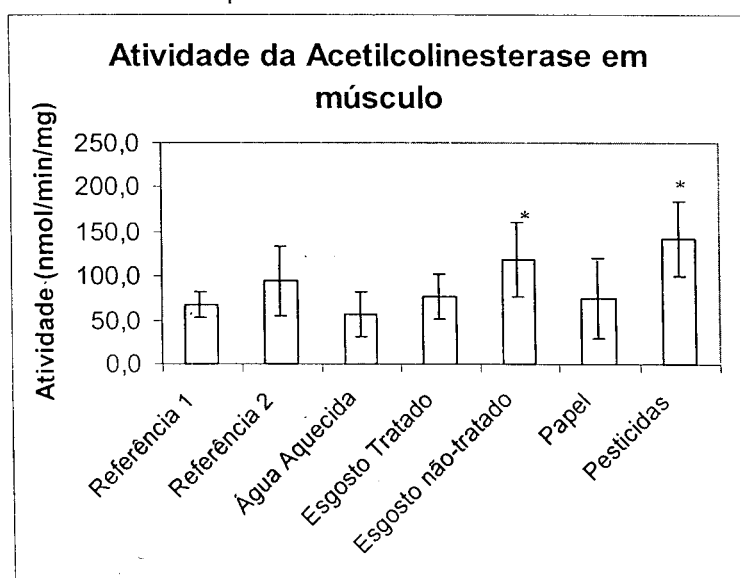


Figura 29- Atividade da Acetilcolinesterase em músculo da espécie *Fundulus heteroclitus* coletada em duas áreas referência e áreas que recebem os seguintes efluentes: água aquecida, Esgoto tratado e não-tratado, indústria de papel e atividade agrícola. * atividade com nível de significância $p < 0.05$. \pm erro padrão n=10

II.4.5- Concentração de Metalotioneína

A medida da concentração de metalotioneína nas brânquias de *Fundulus heteroclitus* apresentou diferenças significativas entre as áreas referência e os efluentes. Novamente, o resultado foi diferente do esperado, uma vez que os indivíduos das áreas consideradas como referências apresentaram uma alta concentração de metalotioneína, enquanto que as brânquias dos animais amostrados nos efluentes água aquecida, esgoto não-tratado e atividade agrícola apresentaram uma baixa concentração dessa proteína (Figura 30). Já nas brânquias dos animais amostrados nos efluentes da indústria de papel e esgoto tratado, a concentração de metalotioneína foi relativamente alta, próximo aos valores observados nos indivíduos das áreas controle (Figura 30).

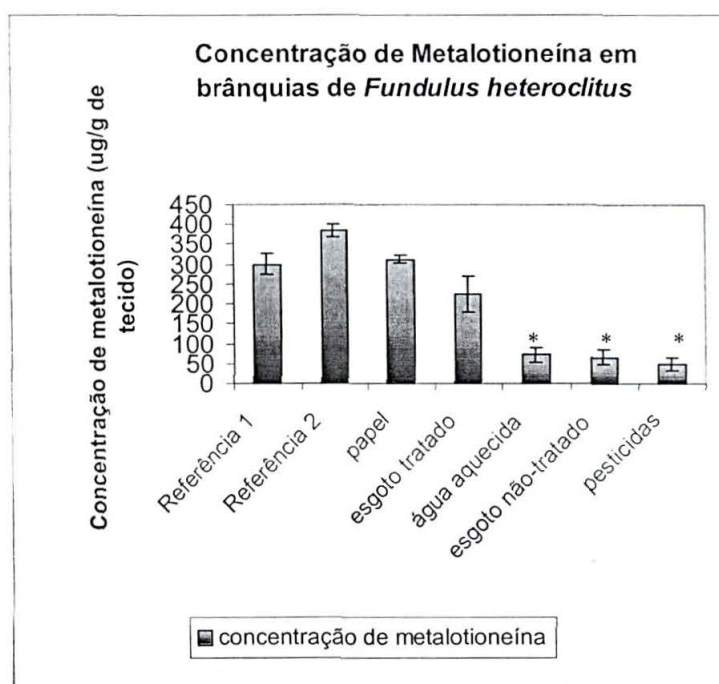


Figura 30- Concentração de metalotioneína em brânquias de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes. * Concentração com nível de significância $p < 0.05$. \pm erro padrão $n=5$ pools com 5 brânquias.

II.4.5- Parasitas

No estudo da comunidade de parasitas de *Fundulus heteroclitus* foram encontradas três espécies de parasitas do filo Myxozoa e duas formas infectantes da família Digenea. Myxozoa é o grupo mais comum encontrado parasitando peixes marinhos. As três espécies de Myxozoa encontradas em *Fundulus heteroclitus* foram *Kudoa funduli*, *Myxobolus subtecalis* e *Myxobolus funduli*. Este grupo apresenta

como principais características: serem pluricelulares, intracelulares, e os esporos são circundados por duas, três ou mais válvulas. As duas formas infectantes de Digenea encontradas foram a larval e a forma adulta. Além da identificação das espécies, também foi feita uma quantificação do número de animais infectados, ou seja, foi feita a prevalência das espécies.

Myxobolus funduli foi encontrado parasitando as brânquias de *Fundulus heteroclitus*. Poucos animais amostrados foram infectados por esta espécie, e nas áreas dos efluentes de pesticidas e água aquecida não houve a ocorrência desses parasitas. Nas demais áreas, a prevalência foi menor que 40%. (Figura 31).

A espécie *Myxobolus subtecalis* foi registrada principalmente nos rins posteriores dos animais amostrados (Figura 37). Não houve a ocorrência dessa espécie nos animais da área referência 1 e do efluente de esgoto não-tratado (Figura 32). Nas demais áreas houve uma alta prevalência, com exceção dos animais do efluente da indústria de papel que apresentou uma prevalência próxima a 60% (Figura 32).

Kudoa funduli foi um valioso parasita encontrado nesse estudo. Esta espécie não é encontrada desde sua descrição por Hahn em 1915 como *Chloromyxum funduli*, isto ocorreu em Woods Hole (Massachusetts - EUA) e mais tarde em 1949, Meglitsch transferiu essa espécie para o gênero *Kudoa*. O interessante, neste resultado, é que quase 100% dos animais analisados estavam infectados pelo *Kudoa funduli*, e estas infecções ocorreram na musculatura esquelética. A menor prevalência observada foi nos animais do efluente da indústria de papel (40%), seguido do efluente pesticida (60%) e água aquecida (80%). As demais áreas apresentaram 100% de prevalência para esta espécie (Figura 33). Os esporos de *Kudoa funduli* foram encontrados em cistos em várias regiões da musculatura, mas também muitas vezes esses cistos estavam rompidos e os esporos estavam espalhados no tecido (Figura 34 e 35). Através da extração dos esporos no cisto, com auxílio de lupa, foi possível separar e observar as quatro válvulas que fazem parte do esporo. Estas válvulas são consideradas a principal característica desse gênero (Figura 36). Para a confirmação da espécie, foi realizado o sequenciamento do DNA ribossomal desses parasitas, através da colaboração com o Prof. Dr. David Cone da St Marys University - Halifax, NS, Canadá e estas análises comprovaram a espécie.

O grupo Digenea também são facilmente encontrados parasitando peixes marinhos. As espécies que compõem este grupo apresentam pelo menos dois hospedeiros. A forma larval Digenea foi observada em brânquias no interior das lamelas primárias (Figura 37) e teve uma alta prevalência (60 - 80%) em quase todas as áreas com exceção da área referência 1, do efluente da indústria de papel e o esgoto não-tratado (Figura 33). Enquanto que a forma adulta foi encontrada no lúmen intestinal de *Fundulus heteroclitus* (Figura 37), e sua prevalência variou entre 20 a 80% nas áreas amostradas, com exceção dos animais do efluente de indústria de papel, onde não foi encontrado nenhuma forma adulta de espécies Digenea. Ainda não foi possível determinar as espécies de Digenea através das análises das lâminas. De uma forma geral, foi evidenciado que existem grandes diferenças na composição de espécies parasitas na comunidade que infecta os indivíduos de *Fundulus heteroclitus* do efluente da indústria de papel.

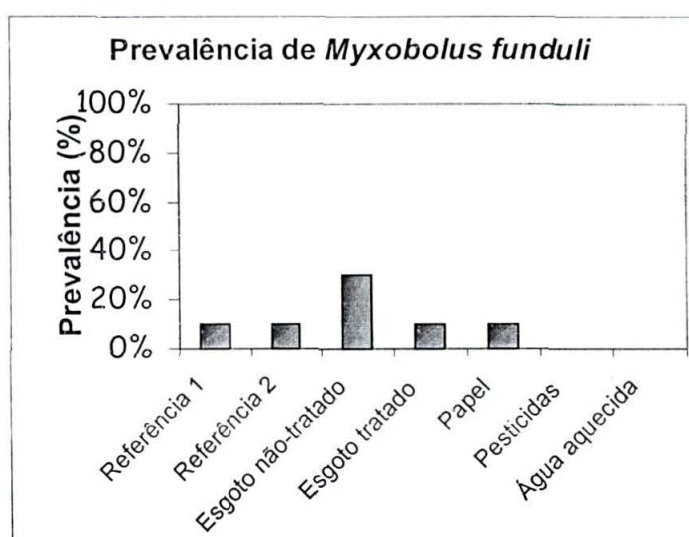


Figura 31- Prevalência (%) de infecção de *Myxobolus funduli* em brânquias de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes n=10

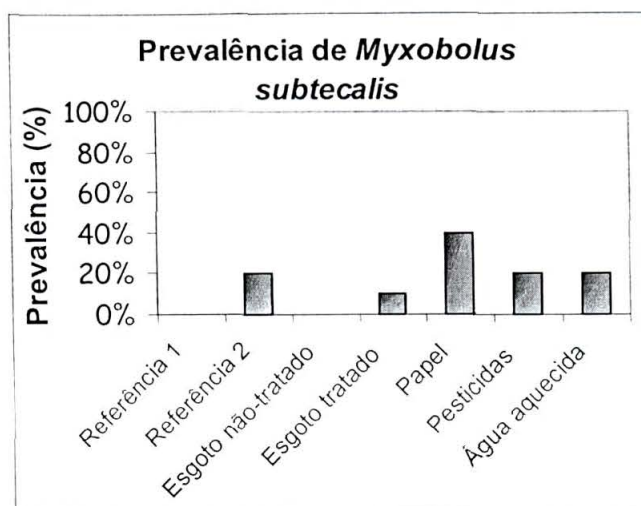


Figura 32- Prevalência de *Myxobolus subtecalis* em rim posterior de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referência e efluentes n=10

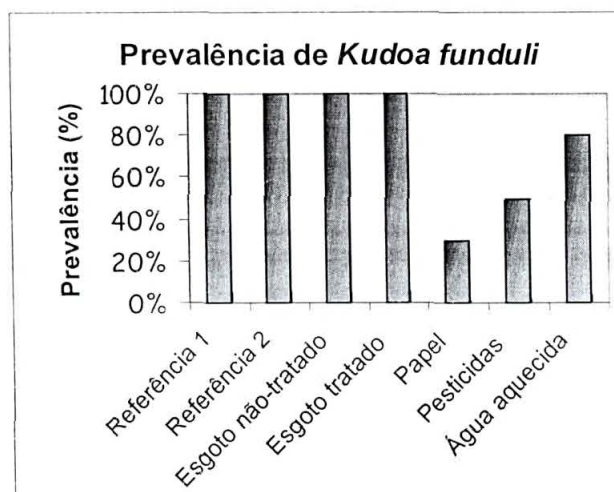


Figura 33- Prevalência de *Kudoa funduli* em musculatura esquelética de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes n=10.

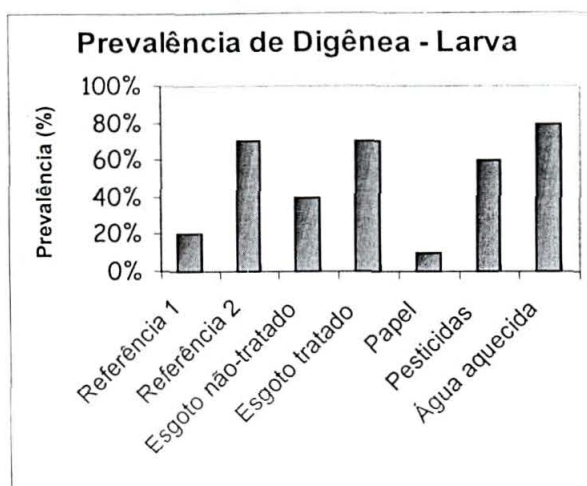


Figura 34 - Prevalência de formas larvais Digenea em brânquias de *Fundulus heteroclitus*, amostrados em áreas referências e efluentes n = 10.

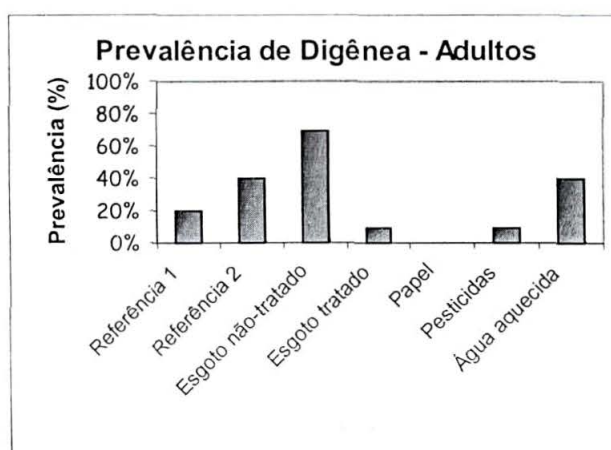


Figura 35- Prevalência de formas adultas de Digenea no lúmen intestinal de *Fundulus heteroclitus* amostrados em áreas referências e efluentes n=10.

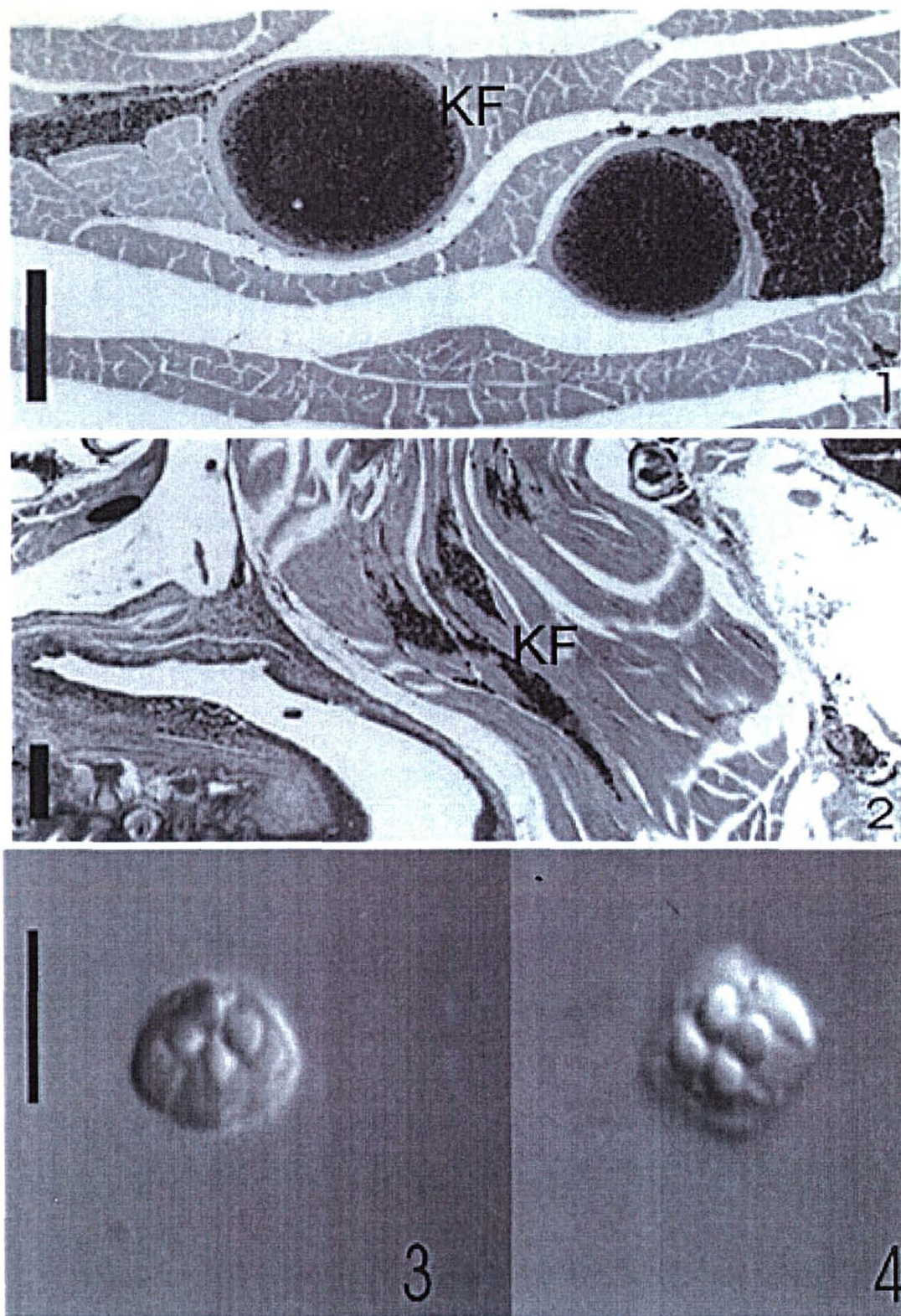


Figura 36 – Microscopia de luz de *Kudoa funduli* em músculo de *Fundulus heteroclitus*. 1- Cistos repletos de esporos de *Kudoa funduli* (KF). Tarja = 15 μ m. 2- Cistos rompidos com extravasamento dos esporos entre as fibras musculares (KF). Tarja = 40 μ m. 3- *Kudoa funduli* na forma de esporos, observe as quatro válvulas presentes nos esporos. Esta é principal característica desse gênero. Tarja= 10 μ m.

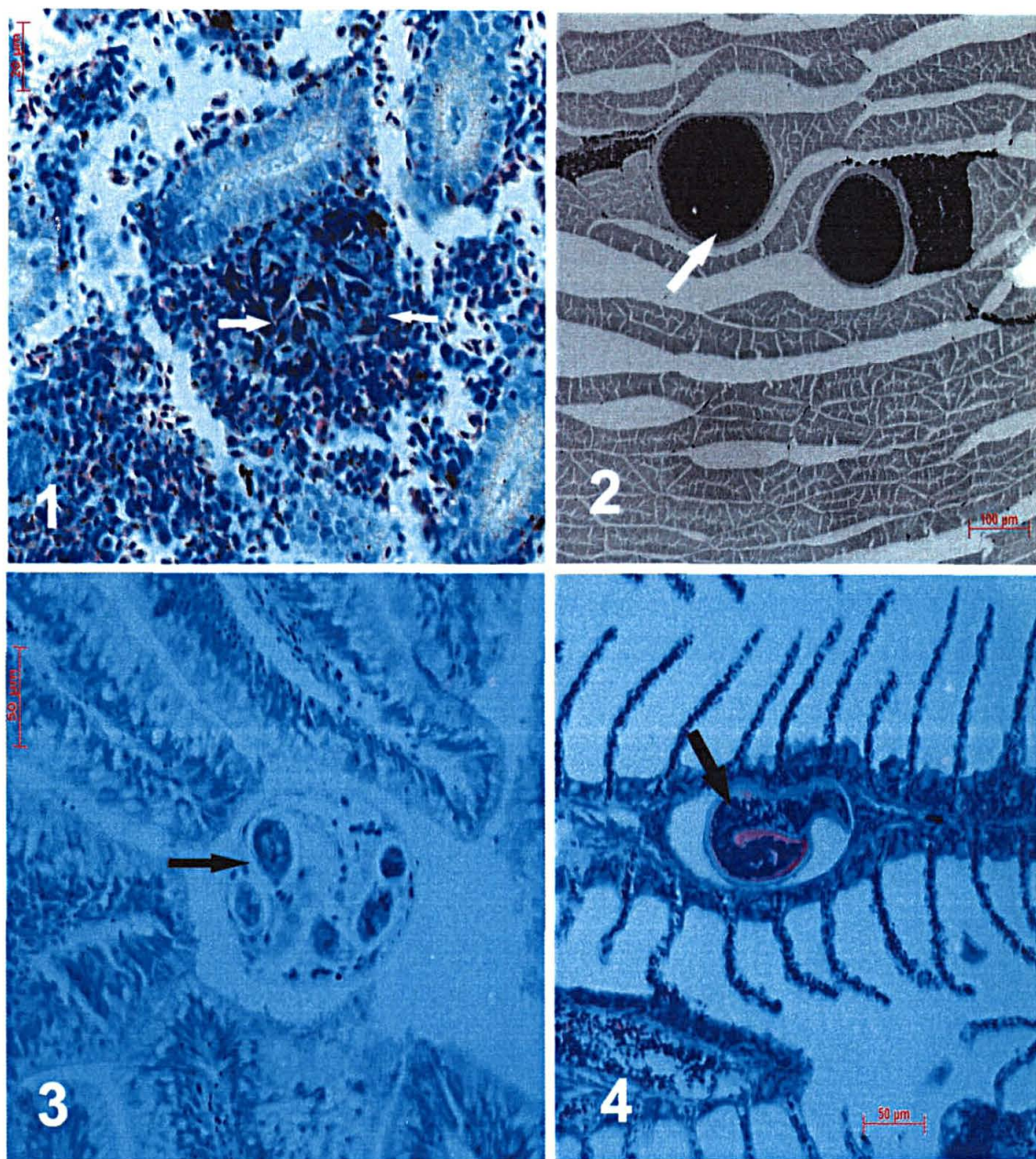


Figura 37- Infecção parasitária em *Fundulus heteroclitus*. Análise em Microscopia de luz. Coloração Giemsa. 1- Rim infectado com *Myxobolus subtecalis* (setas). 2- Músculo infectado por cistos de *Kudoa funduli* (seta). 3- Intestino infectado por indivíduos adultos do grupo Digenea (seta). 4- Brânquias infectadas por larvas de Digenea (Seta).

II.5- DISCUSSÃO

Este trabalho teve uma grande importância do ponto de vista da aprendizagem de metodologias. Os resultados obtidos até o momento ainda não possibilitam uma conclusão definitiva do projeto, mas um ponto muito importante neste estudo foi o aprendizado de metodologias com o uso de vários biomarcadores nos estudos de monitoramento ambiental. Todas as metodologias aprendidas durante essa colaboração, utilizando uma espécie de peixe nórdica, contribuirá muito para o desenvolvimento de futuros projetos aplicando essas mesmas metodologias em espécies tropicais e sub tropicais.

O uso de biomarcadores bioquímicos é uma ótima ferramenta para estudos em toxicologia ambiental. Através destes é possível detectar os efeitos tóxicos de contaminantes nos níveis basais de organização biológica, mesmo que estes xenobiontes estejam em uma baixa concentração no ambiente, uma vez que estes biomarcadores são altamente sensíveis (STEGEMAN et al., 1992). Os biomarcadores bioquímicos usados neste estudo apresentam uma alta especificidade. Estes biomarcadores com alta especificidade associados com outros que são menos específicos, como por exemplo os morfológicos possibilitam uma integração e entendimento dos resultados e consequentemente das respostas dos organismos frente aos contaminantes. A espécie estudada, *Fundulus heteroclitus*, mostrou-se um ótimo bioindicador neste trabalho. Vários outros estudos que envolvem monitoramento ambiental têm utilizado esta espécie como modelo de estudo, por ser abundante no ambiente, facilitando, desta forma, a obtenção dos exemplares e por ser uma espécie residente (MAYERS E FOURNIE, 2002; VALDEZ DOMINGOS, 2001; VOGELBEIN et al, 1997).

Os parâmetros abióticos, temperatura e salinidade, são importantes fatores, quando trata-se de um estudo de monitoramento ambiental, pois estes podem exercer grande influência tanto para as respostas fisiológicas dos animais, como para os processos químicos que ocorrem com os contaminantes no ambiente, favorecendo ou não a biodisponibilidade dos contaminantes. Esses parâmetros também são importantes quando tenta-se relacionar o efeito de contaminantes com a distribuição de populações, como no caso, do estudo de comunidade de parasitas, pois muitos desses organismos sofrem uma grande influência dos fatores abióticos (GALLI et.al, 2001; MACKENZIE et al., 1995).

As diferenças nas medidas de peso de fêmeas e machos dos efluentes esgoto tratado e não-tratado e pesticidas demonstram que esses efluentes podem

estar comprometendo a absorção de nutrientes pelos peixes que habitam essas áreas. VALDEZ DOMINGOS (2001) também realizou um estudo no Porto de Pictou e observou que os peixes amostrados nas áreas que recebem efluente de esgoto tratado e indústria de papel são menores que os das outras áreas. Desta forma, este trabalho é uma confirmação de que realmente, o efluente esgoto inibe de alguma forma o crescimento dos indivíduos da espécie *Fundulus heteroclitus*.

O índice hepatossomático mais alto em alguns efluentes demonstrou que o fígado dos animais dessas áreas está relativamente maior que o das áreas referências. Isto pode ser devido a um aumento do metabolismo para a excreção de contaminantes. Outra explicação para esse alto índice hepatossomático nessas áreas, seria uma hiperplasia das células do fígado o que consequentemente aumentaria o peso do órgão. Muitos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são altamente cancerígenos PADRÓS et.al. (2000) e poderiam ser os causadores do aumento do peso do fígado. A histopatologia de fígado evidenciou relevantes lesões hepáticas em todas as áreas amostradas, mas a principal foi a necrose. No estudo de VALDEZ DOMINGOS (2001), a necrose foi a principal e mais danosa lesão observada em fígado da espécie *Fundulus heteroclitus* amostrados nas áreas que recebem efluente esgoto tratado, indústria de papel e água aquecida no porto de Pictou. Uma variedade de necroses hepáticas foram observadas em *Pseudopleuronectes americanus* amostrados em áreas que recebem esgoto doméstico tratado e não tratado (MURCHELANO e WOLKE, 1991). A principal alteração morfológica observada nas brânquias foi a hiperplasia celular entre as lamelas secundárias, principalmente nos indivíduos amostrados no efluente de indústria de papel. Esta alteração pode estar comprometendo a absorção do oxigênio pelas lamelas secundárias. KHAN et al. (1993), observou esta mesma alteração em brânquias de indivíduos da espécie *Pleuronectes americanus* amostrados no efluente proveniente de indústria de papel.

As medidas de acetilcolinesterase em cérebro e músculo apresentaram um resultado surpreendente. Era esperado que houvesse uma considerável diminuição da atividade da enzima, principalmente, na área que recebe efluentes provindos da atividade agrícola, mas o contrário aconteceu. Isto levanta uma questão com relação qualidade do ambiente das áreas escolhidas como controle. PAYNE et al.(1995) descreveu a inibição da acetilcolinesterase por outros contaminantes aquáticos, como esgoto urbano e efluentes da indústria de papel, isto sugere que o mesmo pode estar acontecendo neste estudo.

A medida da concentração de metalotioneína também apresentou resultados diferentes do esperado. Em ambos casos será necessário realizar uma análise química para se conhecer quais e o quanto de contaminantes podem ser detectados em cada efluente, pois não sabe-se em qual dessas áreas está os mais altos índices de contaminantes. A metalotioneína é um interessante biomarcador, porque são proteínas sensíveis e permitem evidenciar a presença de baixos níveis de metais pesados. Além disso, existe uma boa base de conhecimento científico sobre a síntese de metalotioneína e composição de metais pesados, e isto pode contribuir muito para os estudos que utilizam essa enzima como biomarcador (STEGEMAN et al., 1992).

Estudar a comunidade de parasitas relacionando com as condições do ambiente é um complexo estudo porque é difícil conectar níveis de população de parasitas com ação tóxica de contaminantes sem considerar um número de fatores bióticos e abióticos que podem estar envolvidos (MACKENZIE et al., 1995). Qualquer mudança na comunidade de parasitas é reflexo de mudanças que ocorreram no ambiente, mas uma situação de estresse causado por contaminantes não necessariamente leva a uma diminuição na diversidade de parasitas (MARCOGLIESE e CONE, 1997). Myxosporea e Digenea são os grupos mais comuns de organismos que parasitam peixes.

O reaparecimento da espécie *Kudoa funduli* após 87 anos foi realmente algo inesperado neste estudo. Acredita-se que uma provável resposta para esse reaparecimento seja a influência de águas mornas vindas do estreito de Northumberland para o estuário de Pictou. Muitos estudos de comunidade de parasitas em *Fundulus heteroclitus* foram realizados nos últimos anos na costa atlântica do Canadá, mas em nenhum deles foi encontrada essa espécie de parasita (comunicação pessoal, Cone, D.), principalmente com uma alta prevalência como observado neste estudo. Esta espécie faz parte da classe Myxosporea, possui quatro válvulas e cada uma contém uma cápsula polar. A presença de parasitas desse gênero na musculatura de peixes nórdicos (Salmão, truta e outros de grande valor econômico) é considerada um sério problema para comercialização desses animais, porque todas as espécies do gênero *Kudoa* instalam-se na musculatura dos peixes e após a morte do animal ocorre a explosão dos cistos e a liberação dos esporos que contêm uma substância liofilizadora, a qual degrada a musculatura e reduz o valor comercial dos animais infectados devido a má aparência da carne. Além disso, os cistos infectantes podem ser vistos macroscopicamente, contribuindo

também para essa redução de valor (MORAN et al., 1999). Analisando a salinidade de todas as áreas amostradas, acredita-se que a prevalência das espécies *Kudoa funduli* e *Myxobolus subtecalis* na área que recebe efluente da indústria de papel seja influenciada pela salinidade, pois *Kudoa funduli* é uma espécie tipicamente de ambiente marinho (MORAN et al., 1999), ou seja, estes organismos necessitam de uma alta salinidade para sobreviver e como observado nas medidas de salinidade, o efluente da indústria de papel, pesticidas e água aquecida apresentaram uma baixa salinidade. Ao contrário acontece para *Myxobolus subtecalis*, esta espécie é típica de ambiente dulcícola (MICHAEL et al., 2001), por isso, foi observado uma alta prevalência no efluente indústria de papel e uma baixa prevalência nas áreas com alta salinidade. Assim, acredita-se que a distribuição dessas duas espécies não está sendo influenciada pela ação de contaminantes.

Ainda não foi possível correlacionar a distribuição da espécie *Myxobolus funduli* com a ação tóxica de contaminantes ou mesmo com fatores bióticos e abióticos. Como observado no resultado, a prevalência dessa espécie não demonstrou ser muito diferenciada entre as áreas amostradas, com exceção dos efluentes água aquecida e pesticidas. Nestes dois efluentes a não ocorrência de *Myxobolus funduli* pode estar sendo influenciada pela ação dos pesticidas e da água aquecida, e esta ação possivelmente está ocorrendo diretamente sobre os parasitas, pois esta espécie não possui hospedeiros intermediários (Comunicação pessoal, Cone, D.). Para uma melhor interpretação dos dados obtidos com a prevalência dessa espécie será interessante aguardar futuros dados provenientes de ensaios imunológicos para saber se os animais apresentaram alguma deficiência imunológica que levou a uma maior prevalência de infecção nas áreas consideradas controle e nos demais efluentes, que não pesticida e água aquecida.

A forma larval de uma espécie da família Digenea (Platelmintes) encontrada nas brânquias de *Fundulus heteroclitus* apresentou uma baixa prevalência de infecção no efluente da indústria de papel, e nos demais efluentes essa prevalência foi maior. Já para os adultos do mesmo grupo, que infectavam o intestino de *F. heteroclitus*, não foi observado nenhum indivíduo parasitando os peixes amostrados no efluente indústria de papel e houve uma maior prevalência nas outras áreas. A maioria das espécies da família Digenea possuem um ou mais hospedeiros intermediários (BARNES, 1990). A baixa prevalência desses parasitas no efluente indústria de papel pode ser devido a ação tóxica dos contaminantes do efluente sobre os hospedeiros intermediários ou mesmo sobre os próprios parasitas. Mas,

por outro lado, a ocorrência desses parasitas nas outras áreas controle e efluentes pode ser uma consequência da baixa resistência imunológica no hospedeiro, causada pelos contaminantes. E isto só poderá ser discutido futuramente, com a realização de ensaios imunológicos para esta espécie.

Alguns trabalhos demonstram que quando contaminantes são tóxicos para estágios larvais de parasitas, a eficiência dos processos de transmissão podem ser afetados. EVANS (1982) observou que concentrações de cobre a 10 ppm reduzia significativamente o número de cercárias do *Digenea dulcicola* (*Notocotylus attenuatus*). SIDDALL et al. (1993) observou a diminuição da prevalência do estágio larval de *Digenea* no molusco *Buccinum undatum* com o aumento dos níveis de metais traço e esgoto em "Firth of Clyde" - Escócia.

VALTONEN et al. (1987) observou uma diminuição na prevalência do *digenea Rhipidocotyle illense* em efluente de indústria de papel num lago na Finlândia, atribuindo essa prevalência à diminuição do número de hospedeiro intermediários. Por outro lado, muitos trabalhos observaram um aumento na prevalência de espécies de *Digenea*, Protozoários e *Monogenea* atribuindo este aumento à baixa resistência dos peixes expostos a águas eutrofizadas, efluentes de indústria de papel, esgoto doméstico, metais traços e pesticidas (VALTONEN et al., 1987; VALTONEN e KOSKIVAARA, 1989; THULIN et al., 1988; DAS e SHRIVASTAVA, 1984; SKINNER, 1982).

Com futuras análises químicas e realização de ensaios imunológicos será possível montar um quadro mais definitivo sobre a situação do Porto de Pictou, mas com estes resultados pode-se observar que essa região estuarina sofre a influência de contaminantes antropogênicos e estes estão atuando nos diferentes níveis de organização biológica, seja a nível morfológico ou populacional.

Esse estudo além de proporcionar o aprendizado de novas metodologias, proporcionou a experiência de trabalhar com um ambiente e uma espécie nórdica, os quais apresentam características diferentes da região tropical e subtropical brasileira. Além disso, proporcionou o desenvolvimento de habilidades e metodologias para trabalhar com monitoramento em campo.

II.6 - CONCLUSÕES

- O uso associado de diferentes biomarcadores, possibilitou um melhor entendimento dos efeitos tóxicos de contaminantes de origem antropogênica em ecossistemas aquáticos de uma maneira geral.

- A maior temperatura da água registrada foi no efluente água aquecida e este fator abiótico afeta a fisiologia do animal, assim como a distribuição de parasitas.

- A baixa salinidade no efluente indústria de papel pode ter influenciado a distribuição das espécies de parasita *Kudoa funduli* e *Myxobolus subtecalis*.

- As fêmeas com menor peso corpóreo foram registradas nos efluentes esgoto tratado e pesticidas. E os machos com menor peso foram registrados no efluente esgoto não-tratado. Conclui-se que esses efluentes afetam a alimentação e metabolismo desses animais

- O biomarcador morfológico foi determinante no diagnóstico parcial dos efeitos dos efluentes despejados no Porto de Pictou.

- Os dados da atividade da acetilcolinesterase tanto no cérebro como em músculo mostram que os efluentes despejados no Porto de Pictou não inibem a atividade da acetilcolinesterase se comparado com a atividade da enzima dos indivíduos das áreas referências.

- O resultado da medida da concentração de metalotioneína não estão completamente entendidos, pois há a necessidade da realização das análises químicas de tecido, para a determinação exata da composição de contaminantes existente em cada área estudada.

- Os resultados obtidos com o estudo das metalotioneínas e atividade da acetilcolinesterase, leva-nos a discutir a integridade dos ambientes escolhidos como referência para este trabalho.

- A espécie *Myxobolus funduli* não ocorreu nos efluentes água aquecida e pesticidas e estes talvez estejam influenciando a sua distribuição diretamente, já que esta espécie não possui hospedeiros intermediários, o que implica no desequilíbrio da relação hospedeiro-parasita nesses ecossistemas.

- A prevalência de larvas e adultos de parasitas da família Digenea parece ser influenciada pelos contaminantes presentes no efluente indústria de papel, devido à sua ação tóxica nos próprios parasitas ou nos hospedeiros intermediários.

II.7 -PERSPECTIVAS

- Futuras análises da proteína de estresse, ensaios imunológicos e análise química de tecidos complementarão e concluirão este projeto, respondendo algumas das perguntas e dúvidas que ainda existem com relação a qualidade do ecossistema aquático do estuário de Pictou.

- A colaboração entre diferentes países para o desenvolvimento e aprimoramento de metodologias, bem como para a troca de experiências e preparo de futuros profissionais, é de suma importância para o futuro da pesquisa em países em desenvolvimento e deveriam ser mais incentivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAS, E.; BAUSSANT, T.; BALK, L.; LIEWENBORG, B.; ANDERSEN, O., K. PAH metabolites in bile, cytochrome P450 1A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. **Aquatic Toxicology** v 51 p 241-258, 2000.
- ADAMS, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, 2002.
- ALKINDI, A . Y. A.; BROWN, J. A.; WARING, C. P.; COLLINS, J. E. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and haematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. **Journal Fish Biology** v 49 p 291-305, 1996.
- ANDERSON, J. W.; NEFF, J.M.; COX, B. A .; TATEM, H. E.; HIGHTOWER, G. M. Characteristics of dispersion and water-soluble extracts of crude and refined oil and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. **Marine biology** v 27 p 75-88, 1974.
- BABCOCK, M M. Morphology of olfactory epithelium of pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, and changes following exposure to benzene: a scanning electron microscopy study. *In*: Gray J S, Christiansen M E (eds.), **Marine biology of polar regions and effects of stress on marine organisms**, John Wiley & Sons, New York, p. 259-267, 1985
- BAINY, A. C. D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. **Ciência e Cultura** v 45 p 10-11, 1993.
- BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 4 ed. Roca, p 214-264, 1990.
- BEYERS, D W, SIKOSKI P J. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered Colorado squawfish exposed to cararyl and Malathion. **Environ. Toxicol. Chem** v13 p935-939, 1994.

BIRTWELL, I K.; FINK R.; BRAND D.; ALEXANDER R.; MCALLISTER C.D..

Survival of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fry to adulthood following a 10-day exposure to the aromatic hydrocarbon water-soluble fraction of crude oil and release to the Pacific Ocean. **Can. J. Fish. Aquatic Sci** v 56 p 2087-2098, 1999.

BRADFORD, M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical. Biochemistry**. v 72 p 248-254, 1976.

BRAGA, F. M. S. Estudo entre fator de condição e relação peso/comprimento para alguns peixes marinhos. **Revista Brasileira de Biologia** v 46 p 339-346, 1986.

BRAUNNER, C. J.; BALLANTYNE, C. L.; VIJAYAN, M. M.; VAL, A. L. Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air - breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v 123 p 127-134, 1999.

BROWN, C. L.; GEORGE, C. J.. " Age - dependent accumulation of macrophages aggregates in the Yellow Perch, *Perca flavescens* (Mitchill)". **Journal Fisheries Disease** v 8 p 135-138, 1985.

BURGEOT, T.; BOCQUÉNÉ, G.; PORTE, C.; DIMEET, J.; SANTELLA, R. M.; GARCIA de La PARRA, L. M.; PFHOL-LESZKOWICZ, A.; RAOUX, C., GALGANI, F. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology Progress Series** v 131 p 125-141, 1996.

Chemical Abstract Service. Disponível em: <http://info.cas.org/cgi-bin/segreport.pl>
acesso em: Janeiro/2003

COHEN, A.; NUGEGODA, D.; GAGNON, M. M. Metabolic Responses of fish following Exposure to Two Different oil spill Remediation Techniques. **Ecotoxicology and Environmental Safety** v 48 p 306-310, 2001.

- COLLIER, T. K.; KRONE, C. A.; KRAHN, M. G.; STAIN, J. E.; CHAN, S. L.; VARANASI, U. Petroleum exposure and associated biochemical effects in subtidal fish after the *Exon Valdez* oil spill. **American Fisheries Society Symposium** v 18 p 671-683,1996.
- CORMACK, D. H. **Fundamentos de Histologia**. Guanabara, Rio de Janeiro, p 249, 1996.
- CORREA, M.; GARCIA, H. I. Physiological responses of juvenile white mullet, *Mugil curema*, exposed to benzene. **Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology**. v 44 p 428-434,1990.
- DAS, M. C e SHRIVASTAVA, A . K. Fish mortality in Naini Tal Lake (India) due to pollution and parasitism. **Hydrobiological Journal** v 20 p 60-64, 1984.
- DIMICHELE, L.; TAYLOR, M. H. Histopathological and physiological responses of *Fundulus heteroclitus* to naphthalene exposure. **Journal of Fisheries Research Board Canada** v 35 p 1060-1066,1978.
- ELLMANN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDREAS, V. J.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determinationn of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacologic** v 7, p 88, 1961.
- ENGELHARDT, F. R.; WONG, M. P.; DUEY, M. E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water, as affected by petroleum exposure. **Aquatic Toxicology** v 1 p 175-186,1981.
- EHRHARDT, M.; PETRICK, G. Relative concentrations of dissolved/ dispersed fossil fuel residues in Mediterranean surface waters as measured by UV fluorescence. **Marine Pollution Bulletin** v 20(11) p 560-565, 1989.

- EVANS, N. A. Effects of copper and zinc on the life cycle of *Notocotylus attenuatus* (Digenea: Notocotylidae). **International Journal for Parasitology** v 12 p 363-369, 1982.
- GALGANI, F.; BOCQUENE, G. *In vitro* inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates. **Bulletin Environment Contamination Toxicology** v 45 p 243-249, 1990.
- GALLI, P.; CROSA, G.; MARINIELLO, L.; ORTIS, M.; D' AMELIO, S. Water quality as a determinant of the composition of fish parasite communities. **Hydrobiologia** v 452 p 173- 179, 2001.
- GALLO, M A .; LAWRYK, N. J. Organic Phosphorus Pesticides. *In* Hayes W J Jr, Laws E R Jr (eds) **Handbook of Pesticide Toxicology** 2, (S. Diego: Academic Press) p 917- 1123, 1991
- GERY, J. **Characides of the World**. TFH. Publications - USA. P 671, 1977.
- GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Subordem Characidae. Ed. Fransciscana. São Paulo, v 4. p . 847,1975.
- GOKSØYR, A.; LARSEN, H.E.; HUSON, A. Application of a cytochrome P-450 1A1 - Elisa in environmental monitoring and toxicological testing of fish. **Comparative Biochemical Physiology** 100C, No.1/2, p 157-160,1991.
- GROMAN, D.B. **Histology of the Striped Bass**. American Fisheries Society Monographs. p 36 - 40, 1982.
- GROSSILING, B. F. **An estimate of the amounts of oil entering the oceans, in sources, effects and sinks of hydrocarbons in the aquatic environment**. American Institute of Biological Sciences, Arlington, UA, 1976.

- GUILHERMINO, L.; BARROS, P.; SILVA, M. C.; SOARES, A. M. V.M.
Should the use of inhibition of cholinesterase as a specific biomarker for organophosphate and carbamate pesticides be questioned? **Biomarkers** v.3 n.2 p. 157-163, 1998.
- HABIG, C.; DI GIULIO, R. T. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. *In* P. Mineau (ed), **Cholinesterase - Inhibition insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment**, Elsevier, N.Y pp 19-33, 1991.
- HAMACHER, C.. Determinação de Hidrocarbonetos em Amostras de água e sedimento da Baía de Guanabara. **Dissertação de Mestrado em Química Analítica**. PUC- Rio de Janeiro, p 101, 1996.
- HERBET, A.; GUILHERMINO, L.; DA SILVA DE ASSIS, H. C.; HANSEN, P. D. Acetylcholinesterase activity in aquatic organisms as pollution biomarker. **Angew Zoology**. v 3 p 1-15, 1995.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. *In*: **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Lewis Publishers p 155-208, 1992.
- HINTON, D. E.; LAUREN, D. J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: Potential biomarkers of exposure. *In*: **Biomarkers of Environmental Contamination**. Lewis publishers, p 17-57. 1990.
- HODSON, P. V. Biomarkers and Bioindicators in Monitoring and Assessment: The state of the Art. *In*: Adams, M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, p 591 – 619, 2002.

- HOGAN, J. Some enzymatic properties of brain acetylcholinesterase from bluegill and channel Catfish. **Journal Fisheries Research Board Canada**. v 25(4) p 615-623, 1968.
- HOUK, V. S. The genotoxicity of Industrial wastes and effluents. **Mutation Research**. v 277 p 91- 138, 1992.
- ICES, **International Council for the Exploration of the Sea**. Report of the ICES Workshop on the use of pathology in studies of the effects of contaminations. Project CM/ICES E. p 401-464, 1986.
- JENEY, A .; VALTONEN, E. T.; JENEY, G.; JOKINEN, E. I. Effects of Pulp and Paper Mill Effluent (BKME) on Physiology and Biochemistry of the Roach (*Rutilus rutilus* L.). **Archives of Environment Contamination and Toxicology** v. 6 p 523- 529, 1995.
- KHAN, R. A ., BARKER, D. E., HOOPER, R., LEE, E. M., RYAN, K., NAG, K. Histopathology in Winter Flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and Paper Mill. **Archives Environment Contamination and Toxicology** v 26 p 95-102, 1993.
- KHAN, M.A.Q.; AL-GHAIS, S. M.; AL-MARRI, S. Petroleum hydrocarbons in fish fromm the Arabian Gulf. **Arquives of Environmental Contamination and Toxicology** v 29 n0 04 p 517 - 522, 1995.
- LABROT, F.; RIBERA,D.; SAINT DENIS, M.; NARBONNE,J. F. *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. **Biomarkers**. v 1 p 21-28, 1996.
- LELOUP-HATEY, J.; HARDY, A. Effet d'une pollution par les hydrocarbures sur la fonction interrenale de l'anguille(*Anguilla anguilla*). **Ichthyophysiologica Acta** v 9 p 39-50,1985.

- LEVITAN, W. M.; TAYLOR, M. H. Physiology of salinity-dependent naphthalene toxicity in *Fundulus heterclitus*. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada** v 36 p 615-620, 1979.
- LOPEZ, E.; LELOUP-HATEY, J.; HARDY, A.; LALLIER, F.; MARTELLEY, E.; OUDOT, J.; PEIGOUX-DEVILLE, J.; FONTAINE, Y. A. Modifications histopathologiques et stress chez des *Anguilles* soumises à une exposition prolongée aux hydrocarbures. *In: Amoco Cadiz: Fates and effects of the oil Spill. Proceeding of an International Symposium.* Center Oceanologique de Bretagne, Brest (France) p 645-653, 1979.
- LOWRYS, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **Journal Biology Chemistry** v 193 p 265, 1951.
- MACKAY, D.; SHIU, W.Y.. Aqueous solubility of weathered northern crude oil. **Bulletin Environment Contamination Toxicology** v 15 p 101-109, 1976.
- MACKENZIE, K.; WILLIAMS, H. H.; WILLIAMS, B.; MCVICAR, A. H.; SIDDALL, R. **Parasites as Indicators of Water Quality and the Potential Use of Helminth Transmission in Marine Pollution Studies.** Academic Press Limited, Finland. p86-144, 1995.
- MARCOGLIESE, D. J.; CONE, D. K. Parasite communities as indicators of ecosystem stress. **Parassitologia** v 39 p 227- 232, 1997.
- MARTEL, P.H.; KOVACS, T. G.; VOSS, R. H. Effluents from Canadian Pulp and Paper Mills: A recent investigation of their potential to induce mixed function oxygenase activity in fish. *In: Effluents from Canadian Pulp & Paper Mills.* St. Lucie Press, p 401 – 412, 1996.
- MCBEE, P.; GENEIX, A.; BONTON, P.; CATINOT, P.; PERISSEL, B. Chromosomal aberrations in native small mammals *Peromyscus leucopus* and *Sigmodon hispidus* at a petrochemical waste disposal site:

- I. Standard Karyology. **Archive Environment Contamination Toxicology** v 16 p 681- 688, 1987.
- MEGLITSCH, P. A. On *Kudoa funduli* (Hahn). **Trans. Am. Microsc. Soc.** v 67 p 271-274, 1948.
- MESENGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*), and gilthead seabream (*Sparus aurata*), morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Res** v 277 p 1-1, 10, 1994.
- MICHAEL, L. K., KARL, B. A ., JERRI, L. B., MANSOUR, E., SHERWIN, S. D., ROBERT, H. D., STEPHEN, W. F., RONALD, P. H., RUDOLF, W. H., JASWINDER, K., SASCHA, L. H., ROBERT, J. G. L., MATTHEW, L., OSWALDO, P., MARK, E. S., CHONGXIE, X. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. **The Journal of Eukaryotic Microbiology.** V 48 n 4 p 395-413, 2001.
- MOLES, A. Sensitivity of tem aquatic species to long-term crude oil exposure. **Bulletin Environment Contamination Toxicology** v 61 p 102-107,1998.
- MOORE, M. N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquat. Toxicol** v 59 p 1-15, 2002.
- MORAN, J. D. W., WHITAKER, D. J., KENT, M.L. A Review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. **Aquaculture**, v 172 p 163-196, 1999.
- MURCHELANO, R. A. e WOLKE, R. Neoplasms and Nonneoplastic Liver Lesions in Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Bostom Harbor, Massachusetts. **Environmental Health Perspectives** v 90 p 17-26, 1991.

- MYERS, M. S.; FOURNIE, J. W. Histopathological Biomarkers as Integrators of Anthropogenic and Environmental Stressors. *In*: Adams, S. M **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, p 221-287, 2002
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects**. National Academic Press, Washington, DC. 1985.
- NEFF, H. M. **Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment sources, fates and biological effects**. Applied Science Publishers Ltd. Essex UK, 1978.
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**. 3⁰ed. Jonh Wiley & Sons, Inc. Canada p 271- 272, 1994.
- OLIVEIRA RIBEIRO C.A.; PELLETIER E.; PFEIFFER W.C.; ROULEAU C. Comparative up take, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Science and Technology**, 83:286-292., 2000.
- OLIVEIRA RIBEIRO C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, H. P.; PELLETIER,E.; AKAISHI, F. M. Evaluation of Tributyltin Subchronic effects in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v 51 p 161-167, 2002.
- PADRÓS, J.; PELLETIER, E.; READER, S.; DENIZEAU, F. Mutual *in vivo* interactions between Benzo(a)pyrene and tributyltin in Brook trout (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Toxicology and Chemistry** v 19 p 1019 – 1027, 2000.
- PATTEN, B. G. Sublethal biological effects of petroleum hydrocarbon exposures: fish. *In* **Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Marine Environments and Organisms**. v 2, p319-335, 1977. London: Academic Press.

PAYNE, J. F.; MATHIEU, W.; MELVIN, W.; FANCEY, L. L..
Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in
association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland.
Marine Pollution Bulletin. v 32 p 225-231, 1995.

PICER, M. Simple spectrofluorometry methods for estimating petroleum
hydrocarbons levels in various sea benthic organism. **Chemosphere**. v
37 p 607-617, 1998

POIRIER, A.; LAURENCIN, F. B.; BODENNEC, G.; QUENTEL, C.
Intoxication experimentale de la truite arc-en ciel *Salmo gairdneri*
Richardson, par du gas-oil moteur: Modifications Haematologiques,
histologie. **Acquaculture** v 55 p 115-37, 1989.

PRASAD, M. S.. SEM study on the effects of crude oil on the gills and
airbreathing organs of climbing perch *Anabas testudineus*. **Bulletin of
Environmental Contamination and Toxicology** v 47 p 882-889, 1991.

REDDING, J. M.; DELUZE, A .; LELOUP-HATEY, J.; LELOUP J.
Suppression of plasma thyroid hormone concentrations by cortisol in the
European eel *Anguilla anguilla* . **Comparative Biochemistry and
Physiology** 83 A, 209-413, 1986.

RIGGS, M. R.; LEMLY, A. D.; ESCH, G. W. The growth, biomass, and
fecundity of *Bothriocephalus acheilognathi* in a North Carolina cooling
reservoir. **Journal of Parasitology** v73 p 893-900, 1987.

RUDOLPH, A.; YANEZ, R.; TRONCOSO, L. Effects of Exposure of
Oncorhynchus mykiss to the Water Accommodated Fraction of
Petroleum Hydrocarbons. **Bulletin Environmental Contamination
Toxicology** v 66 p 400-406, 2001.

SAEED,T.; MUTAIRI, M. A.. Chemical Composition of the Water Soluble Fraction of Leaded Gasolines in SeaWater. **Environment International** v 25 p 117-129,1999.

SANTOS, E. **Peixes de Água Doce**. Ed. Itatiaia. Belo Horizonte,1981.

SCHLENK, D.; DI GIULIO, R. T. Biochemical Responses as Indicators of Aquatic Ecosystem Health. *In*: Adams, S. M. **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA. p 13-42, 2002

SCHOOR, W. P.; COUCH,J.A. "Correlation of mixed- function oxidase activity with Ultrastructural Changes in the liver of a Marine fish". **Cancer Biochemistry Biophysics** v 4 p 95-103, 1979.

SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Hepatocellular adaptation of extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. **Fish Physiology Biochemistry** v 5 p 79-97, 1988.

SKINNER, R. H. The interrelation of water quality, gill parasites and gill pathology of some fishes from South Biscayne Bay, Florida. **Fishery Bulletin** v 80 p 269-280, 1982.

SIDDALL, R., PIKE, A .W., MCVICAR, A. H. Parasites of *Buccinum undatum* (Mollusca: Prosobranchia) as biological indicators of sewagepsludge dispersal. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom** v 73 p 931-948, 1993.

SINGER, M. M.; AURAND, D.; BRAGIN, G. E.; CLARK, J. R.; COELHO, G. M.; SOWBY, M. L.; TJEERDEMA, R. S. Standardization of the Preparation and Quantification of Water - accomodated Fractions of Petroleum for Toxicity testing. **Marine Pollution Bulletin** v 40 p 1007 - 1016, 2000.

- SPIES, R. B.; STEGEMAN, J. J.; HINTON, D. E.; WOODIN, B.; SMOLOWITZ, R.; OKIHIRO, M.; SHEA, D. Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara channel. **Aquatic Toxicology** v 34 p 195-219, 1996.
- STEGEMAN, J. J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B. A. ; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P.A. . Molecular Responses to Environmental Contamination: Enzyme and Protein Systems as Indicators of Chemical Exposure and Effect. *In*: Huggett, R. J.; Kimerle, R. A. ; Mehrle, P. M. Jr.; Bergman, H. L. Biomarkers. **Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Antropogenic Stress**. eds. Lewis Publishers, 235- 334, 1992
- STENESH, J. **Biochemistry**. New York : Plenum, 1998.
- STEPHENS, S.M.; ALKINDI, A. Y. A.; WARING, C. P.; BROWN, J.A. Corticosteroid and thyroid responses of larval and juvenile turbot exposed to the water-soluble fraction of crude oil. **Journal Fish Biology** v 50 p 953-964, 1997.
- STURM, A; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research** v 47 p 389-398, 1999.
- SURES, B.; TARASCHEWSKI, H.; JACKWERTH, E. Comparative study of lead accumulation in different organs of perch (*Perca fluviatilis*) and its intestinal parasite *Acanthocephalus lucii*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology** v 52 p 269-273, 1994.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features**. 2o ed. Kodansha Ltd. p 100 - 112., 1995.

- THULIN, J., HÖGLUND, J., LINDESJÖÖ, E. Diseases and parasites of fish in a bleached kraft mill effluent. **Water Science Technology** v 20 p 179-180.
- VALDEZ DOMINGOS, F.X. **Utilização de Biomarcadores Imunológicos e Morfológicos em *Fundulus heteroclitus* (Teleostei, Ciprinodontidae) na Avaliação do Impacto Antropogênico em Pictou, Nova Scotia - Canadá.** Dissertação de mestrado em Biologia Celular. Universidade Federal do Paraná. 2001.
- VALTONEN, E. T. e KOSKIVAARA, M. The effect of environmental stress on trematodes of perch and roach in central Finland (abstract). *In: **Actual Problems in Fish Parasitology*** p 103 2ed. International Symposium of Ichthyoparasitology, Tihany, Hungary, 1987.
- VALTONEN, E. T. e KOSKIVAARA, M. Effects of effluent from a paper and pulp mill on parasites of the roach in central Finland. **Soviet-Finnish Symposium on Fish Parasites of North-Western Europe**, Petrozavodsk, USSR, 163-168, 1989.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. **Marine Environmental Research**. v 44 p 69-84, 1997.
- VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; KRUYNSKI, G.; IWAMA, G. K. Sublethal concentration of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. **Aquatic Toxicology** (*in press*).
- VOGELBEIN, W. K.; ZWERNER, D. E.; UNGER, M. A.; SMITH, C. L.; FOURNIE, J. W. Hepatic and extrahepatic neoplasms in a teleost fish from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated habitat in Chesapeake Bay, USA . *In: ROSSI, L.; RICHARDSON, R.; HARSHBARGER, J, ed. **Spontaneous Animal Tumors Survey***, Genoa, Italy, p 55-63, 1997.

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis. Londres. p 321,1996.

WEIS, J. S.; WEIS, P. Tolerance and Stress in a Polluted Environment. **BioScience** v 39 n 2 p 89 – 95, 1989.

WESTER, P. W.; VETHAAK, A. D.; MUISWINKEL, W. B. Fish as biomarkers in immunotoxicology. **Toxicology** v 86 p 213-232, 1994.

WILLIAMS, J.H.; FARAG, A .M.; STANSBURY, M. A .; YOUNG, P. A .; WOLKE, R. E.; MUERCHELANO, R. A.; DICKESTEIN, C. D. Preliminary Evaluation of the use of macrophages aggregates (MA) as Fish Health Monitors. **Bulletin Environmental Contamination Toxicology** . v 35 p 222-227, 1985.

WILLIAMS, H. H.; MACKENZIE, K.; MCCARTHY, A. M. Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish. **Ver. Fish Biol. Fish** v 2 p 144-176, 1992.

WOODWARD, D. F.; RILEY, R. G.; SMITH, C. E. Accumulation, sublethal effects and safe concentration of a refined oil as evaluated with cutthroat trout. **Arch. Environ. Contam. Toxicol** v 12 p 455-464, 1983.